

Ю.А. Митин

**Лабораторная диагностика
аллергических заболеваний**

Методические рекомендации

Санкт-Петербург

2017

В течение последних десятилетий аллергические заболевания стали серьезной медико-социальной проблемой, существенно снижающей качество жизни населения. Эффективное лечение возможно лишь при своевременном получении сведений о патогенезе аллергического заболевания, где важную роль играет точность диагностики.

В методических рекомендациях подробно рассмотрены основные принципы и методы диагностики аллергических заболеваний, дана полная характеристика лабораторных методов диагностики аллергических заболеваний. Большое внимание уделено методам специфической алергодиагностики, основанным на современных технологиях иммуноанализа, и использованию алергокомпонентов.

Данные рекомендации предназначены для врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-аллергологов, а также окажут неоценимую помощь врачам-клиницистам других специальностей при проведении дифференциальной диагностики заболеваний.

«Лабораторная диагностика аллергических заболеваний».

*Автор: Главный аллерголог Министерства обороны РФ,
д.м.н., профессор Ю.А. Митин (ВМедА, СПб).*

Рецензент: член-корреспондент РАН профессор А.М. Иванов.

© Дизайн ООО «Алкор Био».....2017

© Верстка ООО «Импринт».....2017

© Типография ООО «Светлица»...2017

Оглавление

Введение	5
1. Основные понятия: аллергия, антиген, аллерген, сенсibilизация	6
2. Перекрестные реакции (кросс-реактивность)	14
3. Иммунологические механизмы развития аллергических заболеваний	21
4. Методы диагностики аллергических заболеваний	39
4.1. Сбор алергологического анамнеза	40
4.2. Общее клиничко-лабораторное обследование.....	44
4.3. Клинические методы специфической диагностики аллергических заболеваний (алергодиагностика in vivo)	46
4.4. Лабораторные методы специфической диагностики аллергических заболеваний (аллергодиагностика in vitro)	55
4.5. Использование лабораторных методов в диагностике некоторых форм аллергии	57
5. Цели, задачи и принципы лабораторной диагностики аллергических заболеваний	62
6. Современные варианты и технологии иммуноанализа	71
6.1. Иммунофлуоресцентный анализ.....	72
6.2. Хемилюминесцентный анализ	73
6.3. Иммуноферментный анализ (ИФА)	74

6.3.1. Классические варианты иммуноферментного анализа (ИФА) аллергенспецифических иммуноглобулинов Е.....	76
6.3.2. Варианты ИФА, основанные на технологии выявления аллергенспецифических иммуноглобулинов Е на нитроцеллюлозных мембранах (иммуноблотинг.....	82
7. Технологии создания аллергенов для диагностики и их совершенствование.....	85
8. Особенности интерпретации результатов лабораторных исследований общего и аллергенспецифических иммуноглобулинов Е.....	90
9. Современные технологии проточной цитометрии и возможности их использования в диагностике аллергических заболеваний.....	100
9.1. Возможности проточной цитометрии в определении Th1 и Th2 лимфоцитов.....	101
9.2. Маркеры аллерген-опосредованной активации базофилов.....	102
Заключение.....	104

Введение

Клинико-эпидемиологические исследования, проведенные в последние десятилетия в различных странах мира, показали эпидемический рост аллергических заболеваний. По данным «Белой книги аллергии» среди европейцев отмечен нарастающий рост количества аллергических заболеваний. Так, распространенность только одного аллергического заболевания – атопического дерматита – у детей в Европе составила 15,5%. Эпидемиологические исследования, проведенные в различных регионах России, так же показали высокий рост числа аллергических заболеваний, особенно среди лиц детского возраста (от 30 до 40% популяции). Так, заболеваемость тем же атопическим дерматитом за последние 5 лет в детской популяции РФ по данным эпидемиологических исследований выросла в 1,9 раза. Эти же тенденции свойственны заболеваемости аллергическим ринитом и бронхиальной астмой. Кроме того, повсеместно отмечается рост сочетанных форм аллергии, нарастание тяжести течения большинства аллергических заболеваний. Множество современных исследований посвящено изучению различных аспектов аллергии: роли генетической предрасположенности, экологических и социальных факторов, обуславливающих ее реализацию. Ученые подчеркивают важное влияние загрязненности воздуха и воды, анализируют последствия необоснованного использования лекарственных средств, последствия использования консервантов для приготовления продуктов питания, подчеркивают роль изменения инфекционной заболеваемости, вследствие применения в развитых странах прививок и средств дезинфекции. В результате этих исследований общий прогноз неутешителен – если эти условия не изменятся, рост аллергии продолжится.

В этих условиях значение своевременной диагностики аллергических заболеваний все более возрастает. Как правило, такая диагностика осуществляется комплексно и включает ряд

последовательных этапов: сбор аллергологического анамнеза, клинические и лабораторные исследования, кожные и провокационные аллергические тесты. И если за последние десятилетия сбор анамнеза, методы клинического обследования, методики кожных и провокационных тестов изменились незначительно, то в области лабораторной диагностики аллергии произошли революционные изменения, обусловленные технологическими и методическими достижениями иммуноанализа. Актуальность изучения лабораторных методов диагностики аллергии подчеркивается целым рядом преимуществ, которыми они обладают: быстротой получения и объективным характером результата, полной безопасностью проведения диагностики, отсутствием необходимости отмены лекарственных препаратов, возможностью одномоментного выявления сенсibilизации к большому числу аллергенов (десятки и сотни). Анализу современного состояния, проблемам и перспективам практического использования методов лабораторной диагностики аллергических заболеваний посвящено второе (обновленное и дополненное) издание данных методических рекомендаций.

1. Основные понятия: аллергия, антиген, аллерген, сенсibilизация

Интерес врачей к методам диагностики аллергии закономерен. В настоящее время мы наблюдаем стремительное развитие и совершенствование лабораторных методов диагностики аллергических заболеваний – одной из составных частей иммуноанализа. Все возрастающее влияние на методы лабораторной диагностики оказывают такие дисциплины, как химия высокомолекулярных соединений, клеточная и генная инженерия, под влиянием которых меняются технологии иммуноанализа.

Диагностические потребности приводят к тому, что расширяется число объектов исследований (общий иммуноглобулин

Е, более 1 000 аллергенспецифических иммуноглобулинов Е, различные субпопуляции лимфоцитов). С другой стороны, углубляются и совершенствуются сами методы анализа, меняется процедура его проведения, сокращается время, уменьшается расход реагентов, внедряются автоматизированные высокопроизводительные системы. Идет постоянный поиск новых веществ, которые можно использовать в качестве маркеров аллергических заболеваний, совершенствуются методы их выявления. При развитии новых технологий немаловажным является современное осмысление методологии, включая терминологию, классификации и определения аллергических болезней. Однако до сих пор нет единства в определении основных терминов аллергологии: аллергена и сенсibilизации.

Так, академик А.Д. Адо называл аллергенами «вещества органической или неорганической природы, способные вызвать состояние аллергии» (А.Д. Адо, 1978). И.С. Гущин сформулировал, что «аллергены представляют собой антигены, которые способны формировать сенсibilизацию организма, обусловленную преимущественно IgE антителами» (И.С. Гущин, 1998). «Медицинский толковый словарь» определяет аллерген как «вещество, способное сенсibilизировать организм и вызвать аллергию» (В.Л. Ривкин, 2002).

Существует множество определений двух составляющих аллерген – антигенности и характера, вызываемого им действия (аллергическая реакция, аллергическое заболевание, сенсibilизация, аллергия).

Если сопоставить известную нам информацию об аллергенах, можно дать определение на основе синтеза уже известных науке фактов – **аллерген является веществом, которое вызывает иммунный ответ**. Однако в иммунологии вещества, которые способны вызывать иммунный ответ, принято называть антигенами, а не аллергенами.

В учебнике «Иммунология» (Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович, 2000) антигенами авторы называют «вещества, или те формы веществ, которые при введении во внутреннюю среду организма способны индуцировать на себя иммунный ответ в виде выработки специфических антител и/или иммунных Т-лимфоцитов», а «Медицинский толковый словарь» определяет аллерген как «вещество, способное стимулировать лимфоидные клетки и тем самым обеспечивать иммунный ответ» (В.Л. Ривкин, 2002). В более позднем учебнике «Иммунология» (А.А.Ярилин, 2010) автор определяет: «Антигенами называют молекулы, способные вызывать иммунный ответ, т.е. комплекс реакций, направленных на их удаление из внутренней среды организма». Таким образом, и определения антигена у разных авторов различаются, однако можно отметить общие черты, подчеркиваемые всеми.

Во-первых, антигены – это вещества, что подчеркивают все авторы.

Во-вторых, эти вещества должны обладать главным свойством, связанным с их воздействием на иммунную систему – иммуногенностью (способностью вызывать иммунный ответ в виде продукции специфических антител или специфических рецепторов клеток). Иммуногенность же обусловлена 2 свойствами: наличием эпитопа и достаточной для реагирования молекулярной массой вещества. Эпитоп – участок молекулы антигена, способный вступать в связь (ионную, водородную, ван-дер-ваальсовую, гидрофобную) с активным центром антитела или рецептором клеток.

Способность вызывать иммунный ответ, т.е. быть иммуногеном, возникает у веществ только с определенной молекулярной массой. Эксперименты показали, что подавляющее большинство веществ, молекулярная масса которых превышает 10 000 дальтон, являются иммуногенами, а менее 5 000 дальтон

не являются таковыми. Известны вещества, не обладающие достаточной для иммунной реакции «критической» (более 5 000 дальтон) молекулярной массой и, как следствие, иммуногенностью, которые носят название гаптен (неполных антигенов). К таким веществам относится большинство полисахаридов, нуклеиновых кислот, липидов, отдельные пептиды, металлы. Однако если увеличить их молекулярную массу (полимеризация, конъюгация с белком и т.п.), то образующийся комплекс становится иммуногенным. Следовательно, гаптены, присоединяясь к другим веществам и увеличивая свою молекулярную массу, могут стать полными антигенами или аллергенами.

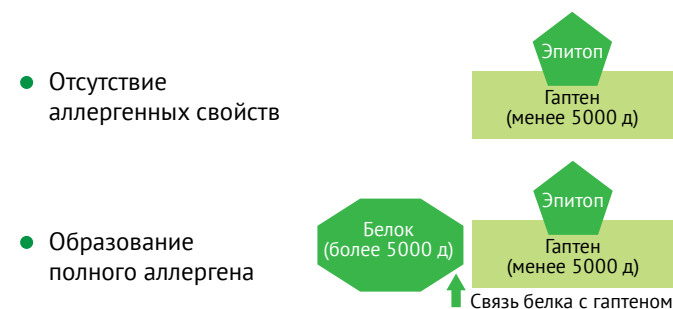


Рис. 1. Патогенетический механизм трансформации гаптена в аллерген.

Полные антигены обладают составом определенной сложности. Так, если обратить внимание на химический состав таких полных антигенов, то выяснится, что антигенов, состоящих только из атомов одного вида (только из одного химического элемента) нет. Следовательно, по химическому составу, антиген не простое, а сложное вещество. Дадим определение антигена.

Антиген – иммуногенное сложное вещество, обладающее эпитопом и критической молекулярной массой.

Обладает ли аллерген всеми свойствами антигена? Разберем свойства аллергена по аналогии с антигеном. Итак, известно:

1. аллергены это сложные вещества. Так же как антигены, полноценные аллергены не состоят из атомов одного вида;
2. эти вещества должны обладать свойством, связанным с их воздействием на иммунную систему, сходным с иммуногенностью (способностью вызывать иммунный ответ в виде продукции специфических антител или специфических рецепторов клеток). Такое свойство аллергены имеют. Это свойство называют аллергенностью – способностью вызывать специфически (аллергически) измененный иммунный ответ – аллергическую реакцию. Также как и при обычном иммунном ответе, в аллергической реакции принимают участие антитела и клетки иммунной системы;
3. аллерген, так же как антиген, специфичен, что обусловлено наличием эпитопа или эпитопов;
4. для него, как и для антигена, соблюдается закономерность, связанная с необходимостью наличия критической молекулярной массы (более 5 000 дальтон).

Таким образом, аллерген в полной мере обладает всеми свойствами антигена – способен вызывать иммунный ответ, имеет эпитоп и молекулярную массу, превышающую критическую. Аналогично антигену, аллерген может быть образован из гаптена. Однако возникает резонный вопрос, чем же аллерген отличается от антигена? По-видимому, принципиально, только одним свойством – ответом иммунной системы. Вследствие внутренних изменений иммунной системы, предшествующих формированию аллергии, на воздействие отдельных антигенов возникает особый, измененный, приводящий к появлению сенсibilизации или аллергической реакции, иммунный ответ, что выделяет этот антиген из массы других, т. о. превращая его из антигена в аллерген.

Аллерген – иммуногенное сложное вещество, обладающее эпитопом, критической молекулярной массой, иммунный ответ

на которое реализуется сенсibilизацией или аллергической реакцией.

Основные классы аллергенов:

Пищевые аллергены:

f1...n – пищевые продукты.

Пыльцевые аллергены:

Международное обозначение:

g1...n – пыльца луговых трав (каждый вид имеет индивидуальный порядковый номер, например, g1-колосок душистый);

w1...n – пыльца сорных трав;

t1...n – пыльца деревьев и кустарников.

Ингаляционные аллергены:

h1...n – домашняя пыль с различным содержанием эпидермальных аллергенов, микрочлещей и др.;

d1...n – микрочлещи.

Аллергены условно патогенных микроорганизмов и грибов (плесеней):

m1...n – грибы и плесени.

Эпидермальные аллергены:

e1...n – эпидермальные аллергены и белки животного происхождения.

Инсектные аллергены:

i1...n – инсектные аллергены и яды насекомых.

Лекарственные аллергены:

c1...n – лекарственный препарат.

Профессиональные аллергены:

k1...n – профессиональные аллергены.

Паразитарные аллергены

p1...n – паразитарные аллергены.

Для развития аллергической реакции требуется наличие измененной реактивности – сенсибилизация к определенному аллергену. Организм, ткани и клетки которого способны отвечать на воздействие реакцией гиперчувствительности, называют сенсибилизированным. Формирование, длительность сохранения сенсибилизации зависят от пути проникновения аллергена (чаще парентерально или ингаляторно), дозы (чаще на небольшие или сверхбольшие количества – сенсибилизирующая доза), природы аллергена (к некоторым аллергенам абсолютная чувствительность), длительности воздействия, но, главным образом, от наличия нарушений иммунной реактивности.

В процессе развития сенсибилизации используются типовые патогенетические механизмы иммунного ответа. Известно, что иммунный ответ на аллерген развивается в течение определенного времени. В первую фазу происходит развитие и закрепление специфически измененного иммунного ответа – сенсибилизация – т. е. переход от нормальной реакции на антиген к патологически (обязательно иммунологически) измененной. Вторичный иммунный ответ на антиген, также как при аллергии, характеризуется повышенной силой (а при аллергии чрезмерно повышенной гиперчувствительностью), сокращением времени ответа, наличием структур, реагирующих иным образом на специфический антиген – клеток иммунологической памяти, эффекторов гиперчувствительности замедленного типа, специфических антител.

Сенсибилизация может быть активной, когда организм своими силами полностью реализует механизмы аллергии и пассивной, формирующейся при введении специфических антител или сенсибилизированных лимфоцитов из другого организма, например, при переливании крови от сенсибилизированных лиц к несенсибилизированным. Сенсибилизация является результатом не только неоднократного попадания антигена в организм, но, обязательно, связана с предшествующими наруше-

ниями иммунорегуляции. Становление сенсибилизации может происходить в течение 2-х и более недель, но, сформировавшись, она может сохраняться месяцы, годы и даже всю жизнь. Важно подчеркнуть, что антиген становится аллергеном, способным вызывать аллергические реакции, в результате процесса сенсибилизации. Иными словами, только сенсибилизация превращает антиген в аллерген.

Сенсибилизация проявляется и еще одним важным изменением – изменением силы (аффинности) рецепции аллергенов. Аффинность – сила связи эпитопа антигена и активного центра антитела (рецептора клеток). Появляются не только высокоаффинные (сильносвязывающие) аллергенспецифические иммуноглобулины Е, но и высокоаффинные аллергенспецифические лимфоциты, участники аллергических реакций четвертого типа, которые представляют собой специализированные на ответных реакциях по отношению к аллергену клетки, несущие на своей мембране аллергенспецифические рецепторы. Кроме этого низкоаффинные рецепторы (слабосвязывающие) к IgE появляются на целом ряде тех клеток, где они ранее не были представлены. В иммунной системе при аллергии, таким образом, происходит как нарастание уровня реагирующих на аллерген структур антител и рецепторов на клетках крови и тканей, так и качественные изменения этих структур – возрастание аффинности ряда антител и рецепторов, изменение представительства как низкоаффинных, так и высокоаффинных рецепторов.

Обобщая важнейшие качественные изменения иммунной системы, происходящие при сенсибилизации можно выделить следующие:

- появляются специфически реагирующие на аллерген структуры – аллергенспецифические лимфоциты и аллергенспецифические антитела.
- растет число высокоаффинных и низкоаффинных рецепторов

к IgE на иммунокомпетентных клетках и клетках-мишенях.

- возникает широкое представительство специфически реагирующих на аллерген структур в органах и тканях.

Сенсибилизация – специфически повышенная реактивность иммунной системы, обусловленная наличием аллергенспецифических антител и лимфоцитов (в том числе клеток иммунологической памяти), а также появлением и ростом представительства рецепторов различной аффинности для связывания аллергенспецифических антител в органах и тканях.

2. Перекрестные реакции (кросс-реактивность)

Перекрестные реакции – иммунное реагирование специфических антител с 2 и более различными антигенами (аллергенами).

Молекулярные механизмы перекрестных реакций

Связь антител с молекулой антигена происходит посредством соединения активных центров антител с эпитопом антигена. Для антигенов с повторяющейся структурой, например полисахаридов, характерны однотипные (одной специфичности) эпитопы. Белкам, например, напротив, свойственно наличие разнообразных эпитопов, к каждому из которых могут вырабатываться собственные специфические антитела. В такой молекуле белка устанавливается иерархия эпитопов, когда один из них вызывает преимущественное образование антител (явление иммунодоминантности). После искусственного удаления доминантного эпитопа преимущественная выработка антител осуществляется в отношении уже другого эпитопа данного белка.

Связь антиген-антитело (или антиген-рецептор клеток) объясняется природой пространственного соответствия (компле-

ментарности) активного центра антитела и эпитопа антигена, по типу «ключ-замок». В таком взаимодействии эпитоп выполняет роль ключа, а активный центр антитела – замка. Следовательно, чтобы проникнуть в активный центр антитела эпитоп должен быть по размерам несколько меньше. Так, размер эпитопа составляет до 4 нм, а активного центра – 6 нм. Чем больше пространственное соответствие и больше точек соприкосновения молекул, тем выше степень родства между активным центром антитела и эпитопом. Приведем пример такого взаимодействия. Эпитоп Z, например, имеет 7 аминокислотных остатков, которые мы обозначим соответствующими цифрами – 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, и может связываться через них с участками активного центра антитела. Если у антитела есть все 7 точек связывания, то связь будет наиболее прочной. Но и при 4 или 5 или 6 точках такая связь тоже возможна. Следовательно, может существовать большое разнообразие антител различной специфичности, имеющих например набор 1, 3, 4 или 2, 5, 6, 7 не похожих друг на друга, но имеющих возможность такой связи с антигеном Z.

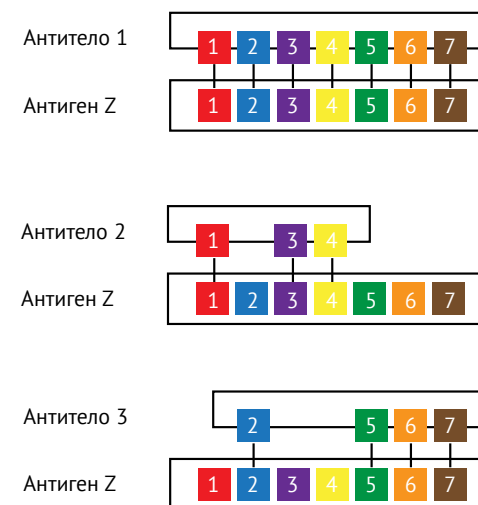


Рис. 2. Связи антигена Z по 7 точкам, а также 1,3,4 и 2,5,6,7 точкам.

Данные закономерности свойственны линейным молекулам. Однако белки имеют сложную пространственную структуру, при этом гидрофильные остатки представлены на поверхности молекулы, а гидрофобные – в ее глубине. Эпитопы, как правило, соответствуют гидрофильным поверхностным структурам. Однако при свертывании белковой молекулы участки отдаленные друг от друга в линейной последовательности могут сближаться. Так вместе с линейными формами эпитопов могут возникать и конформационные. Существование конформационных форм эпитопов можно продемонстрировать на примере молекулы лизоцима. Нативная молекула этого белка содержит петлю, которая создает особую пространственную конформацию эпитопа лизоцима. После иммунизации лизоцимом антитела к нему через свои активные центры соединяются с эпитопом лизоцима, имеющего дисульфидную связь. Если произвести разрыв дисульфидной связи эпитопа, в результате чего возникнет нарушение его конформации, то утрачивается возможность связи активного центра антитела с таким конформационно-измененным эпитопом.

Иммунные механизмы перекрестных реакций

Перекрестные иммунные реакции – иммунные реакции между антителами, образованные к аллергену 1 (например, Bet v1 березы) с аллергеном 2 (например, Mal d 1 яблока).

Иммунные реакции осуществляются за счет взаимодействия эпитопов антигенов (аллергенов) и активных центров антител (иммуноглобулинов).

Так, аллерген Bet v1 березы и аллерген Mal d 1 яблока имеют схожую структуру (схожие эпитопы), что делает возможным взаимодействие одного и того же антитела как с аллергеном Bet v1 березы, так и с аллергеном Mal d 1 (рис. 3).

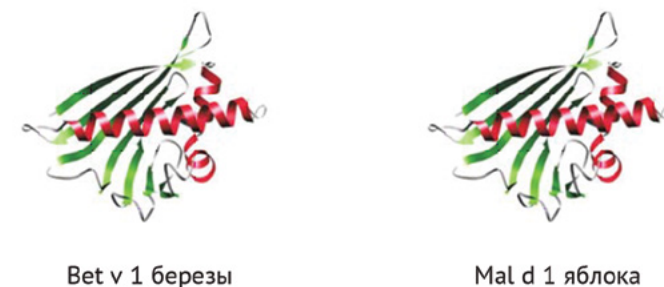


Рис. 3. Аллергокомпонент Березы Bet v 1 и яблока Mal d 1.

В результате такой связи возникают последствия в виде реакции иммунной системы. Для того чтобы понять механизмы перекрестного реагирования введем представления об аллергенном продукте и аллергенном компоненте.

Аллергенные продукты – вещества животного, растительного, молекулярно-биологического происхождения, включающие более одного аллергенного компонента (аллергокомпонента). Примером аллергенного продукта может служить коровье молоко, включающее множество аллергенных компонентов, таких как белки сыворотки Bos d4, Bos d5, Bos d6 или казеины Bos d8 (Табл. 1).

Аллергенный компонент – аллерген из состава аллергенного продукта.

Исторически сложилось так, что аллергенные продукты называют аллергенами, например, аллерген «коровье молоко», хотя, по сути, аллергенами являются именно компоненты, входящие в состав коровьего молока. В настоящее время, говоря об аллергенах, лучше называть их в соответствии с международной классификацией, например: «аллерген Bet v1 березы», а не так как называли ранее: «аллерген березы».

Таблица 1. Аллергенные компоненты коровьего молока.

Группа	Аллергенные компоненты	Молекулярная масса (кДа)
Казеины (Bos d8):	as1	23-27
	fs	24
	k	19
	Y1-3	12-21
Белки сыворотки:	β-лактоглобулин (Bos d5)	36
	α-лактальбумин (Bos d4)	14
	Сывороточный альбумин (Bos d6)	66-69

Перекрестные реакции, возникающие между различными аллергенными продуктами

Перекрестные реакции на аллергенные продукты – иммунные реакции между антителами, образованные к аллергенному компоненту одного аллергенного продукта с аллергенными компонентами другого аллергенного продукта. Такие реакции могут возникать и как перекрестные иммунные реакции и на общие для этих аллергенных продуктов белки (чаще всего паналлергены).

Родственные между собой аллергены, например аллергены различных пищевых продуктов, пыльцы растений, латекса, лекарственных препаратов растительного происхождения, могут обладать антигенно сходными или даже одинаковыми эпитопами, что обуславливает возможность перекрестного реагирования антител, образующихся к одному аллергенному компоненту со сходными аллергенными компонентами других групп. Для достоверного возникновения перекрестного реагирования достаточно 70% идентичности аминокислотной последовательности в эпитопах аллергенных компонентов (рис. 4).

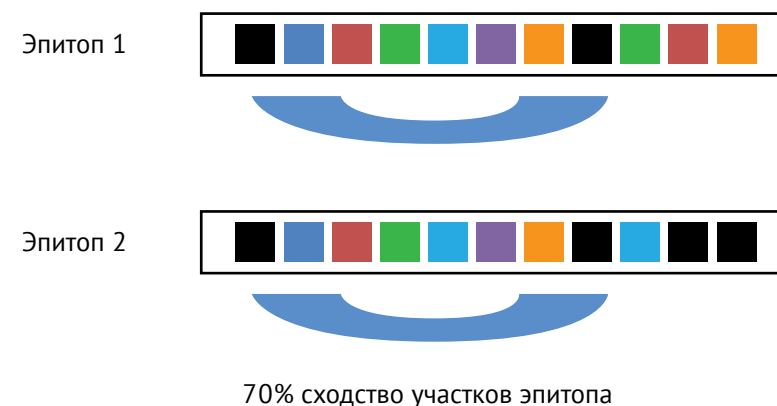


Рис. 4. Схема аминокислотной последовательности в антигенно-сходных эпитопах (цветные квадраты - аминокислоты).

Это подтверждается различными клиническими данными. Так, у пациентов имеющих сенсibilизацию к белкам коровьего молока, в 90% случаев выявляют сенсibilизацию к кобыльему или овечьему молоку, а пациенты, имеющие сенсibilизацию к кобыльему молоку, могут реагировать на аллергены конского волоса. При пищевой аллергии на куриное яйцо возможны перекрестные реакции на аллергены яиц родственных курам птиц, например, индейки, гуся, чайки, утки. Описан синдром «bird-egg», при котором аллергия к белкам яиц птиц сопровождается повышенной чувствительностью к мясу, перьям и помету птиц. Обнаружено перекрестное реагирование между аллергенами разных видов рыб. Наличие общих главных аллергенов, например тропомиозина у ракообразных, может создавать условия возникновения реакций на различные их виды – на креветки, раков и крабов, следовательно больные с сенсibilизацией на креветки могут реагировать на другие ракообразные без дополнительной сенсibilизации. Описан синдром «pork-cat», характеризующий частый перекрест между аллергеном свинины и аллергеном эпителия кошки.

Те аллергены, которые часто вызывают перекрестные реакции между аллергенами различных групп обозначают термином «паналлергены». К таким аллергенам относятся, например, профилины – актинсвязывающие протеины, которые являются основой цитоскелета растений, образованного актиновыми волокнами (филаментами).

Перекрестные реакции между паналлергенами

Профилины являются причиной возникновения большого числа перекрестных реакций, прежде всего береза-полынь-фруктово-овощного синдрома. Поэтому у пациентов с поллинозом, обусловленным реакцией на аллергены пыльцы березы Bet v2, может формироваться перекрестная сенсibilизация к различным пищевым аллергенам, например Api g4 сельдерея, Pru c4 груши, Pru av4 вишни, Ara h5 арахиса, а аллерген пыльцы березы Bet v 1 может участвовать в перекрестных реакциях с аллергенами Mal d1 яблока, Api g1 сельдерея, Pru c 1 груши, Pru ar 1 абрикоса (Табл. 2).

Один из профилинов – Nev 8 выявлен в латексе. Сенсibilизация к аллергену латекса Nev 8 может обусловить тяжелые анафилактические реакции на арахис и сою, содержащие профилины. Другой аллерген латекса – Nev 2 гомологичен аллергенам многих фруктов, таких как авокадо, бананы, киви, каштаны, а также овощей – томатов и картофеля, что явилось основой развития «латекс-фрукт» синдрома перекрестных реакций у сенсibilизированных к аллергенам латекса лиц. Сенсibilизация к аллергену березы Bet v 1 часто сочетается с сенсibilизацией к гомологичным аллергенам цветущих растений, фруктов и овощей: аллергену пыльцы орешника Cor a 1, яблока и вишни Pru av 1, абрикоса Pru ar 1, моркови Dau c 1, груши Pru c 1, что обуславливает частое наличие перекрестных реакций у сенсibilизированных к аллергену пыльцы березы Bet v 1.

Таблица 2. Перекрестные реакции аллергенных продуктов.

Аллергенный продукт и его аллергенный компонент	Перекрестно-реагирующий аллергенный продукт и его аллергенный компонент	Клинические реакции	Причина перекрестных реакций
Пыльца березы (Bet v1)	Яблоко (Mal d1) Сельдерей (Api g1) Груша (Pyr c1) Абрикос (Pru ar 1) Орешник (Cor a 1) Морковь (Dau c 1)	Береза-полынь-фруктово-овощной синдром	Гомология между профилинами (PR-10)
Пыльца березы (Bet v2)	Сельдерей (Api g 4) Груша (Pyr c 4) Вишня (Pru av 4) Арахис (Ara h 5)		
Латекс (Hev b 5)	Киви (Act c 1)	Латекс-фрукт синдром	Гомология между профилинами (PR-2)
Яблоко (Mal d 3)	Персик (Pru p 3) Абрикос (Pru ar 3) Слива (Pru d 3)	Оральный аллергический синдром, системные проявления пищевой аллергии)	Гомология LTP (липидо-транспортных белков)
Кошка (Fel d 1)	Собака (Can f 3)	Респираторные реакции	Гомология

3. Иммунологические механизмы развития аллергических заболеваний

В настоящее время общепризнанной мировой классификацией аллергических реакций является классификация, предложенная в 1975 году P. Gell и R. Coombs. В ее основу положено разделение реакций по иммунным механизмам. Реакции подразделяются на 4 основных типа:

Таблица 3. Типы аллергических реакций.

Тип	Тип реакции	Иммунный механизм реакции	Клинические примеры
1	Анафилактический	IgE и IgG4	анафилаксия, атопическая бронхиальная астма, некоторые формы крапивницы и конъюнктивита
2	Цитотоксический	IgG и IgM	иммунные цитопении, поражения почек при синдроме Гудпасчера, гемолитическая болезнь новорожденных, лекарственная аллергия
3	Иммунокомплексный	IgG и IgM	сывороточная болезнь, системная красная волчанка (СКВ), экзогенный аллергический альвеолит
4	Гиперчувствительность замедленного типа	Сенсибилизированные лимфоциты	аллергический контактный дерматит, туберкулиновая проба при туберкулезе

Следует подчеркнуть некоторую методическую искусственность данной классификации. Это связано с тем, что у больных крайне редко существуют изолированные друг от друга типы реакций. Наиболее характерно сочетание двух-трех или даже всех типов реакций, выраженных в различной степени.

Все аллергические реакции в своем развитии проходят 3 стадии: иммунологическую – патохимическую – патофизиологическую.

Иммунологическая (иммунная) стадия – связана с развитием иммунного ответа на аллерген; образуются реагирующие с аллергеном антитела (IgE и IgG4, IgG и IgM) или сенсибилизированные лимфоциты.

Патохимическая стадия – обусловлена выбросом (дегрануляцией) медиаторов из клеток-мишеней, реагирующих на иммунные взаимодействия;

Патофизиологическая стадия – реакция тканей на выделившиеся (в патохимическую стадию) медиаторы.

Роль CD4+ Т-лимфоцитов в патогенезе аллергических заболеваний

В настоящее время общепризнанной является концепция, основанная на участии CD 4+ субпопуляции Т-лимфоцитов в патогенезе аллергических заболеваний. Основу ее составляет представление о ведущей роли в реализации аллергии лимфоцитов Th2 (Т-лимфоцитов хелперов 2 класса). Th2-лимфоциты образуются из предшественников – Th0 (Т-лимфоциты хелперы нулевые). Дифференцировка нулевых (Th0) CD4+Т-лимфоцитов происходит по 2 принципиально различным путям – либо к Th1 либо к Th2, что приводит в конечном итоге к продукции различных интерлейкинов (рис. 5).

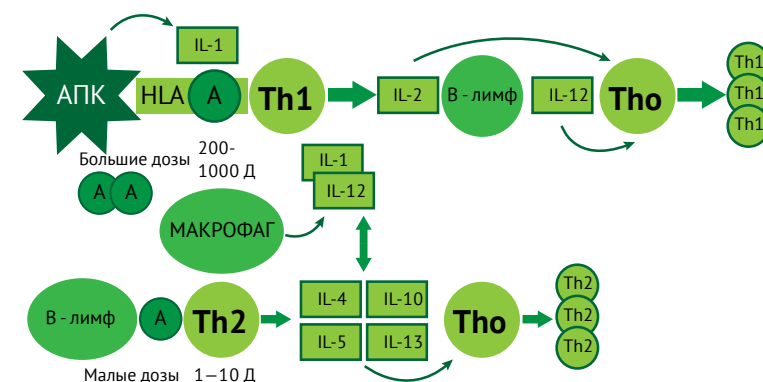


Рис. 5. Активация и дифференцировка нулевых (Th0) CD4+ Т-лимфоцитов.

Между Th2 и Th1 существуют антагонистические взаимоотношения, приводящие к возникновению обратных связей, при которых секреция одних лимфокинов вызывает эффект подавления секреции их антагонистов (рис. 6).

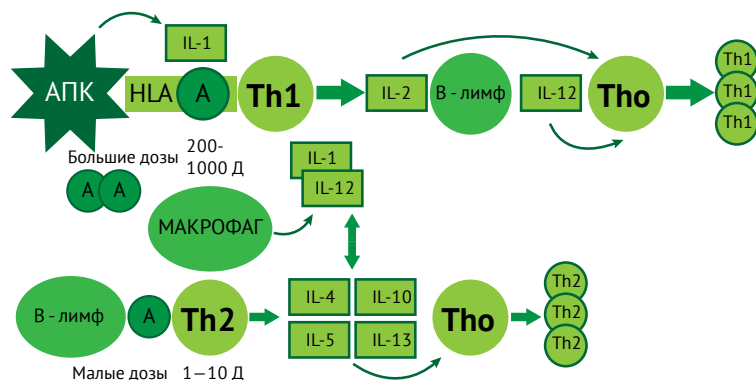


Рис. 6. Иммунные механизмы развития реакций гиперчувствительности.

Примечание: АПК – антигенпрезентирующая клетка; IL – интерлейкин; А – антиген (аллерген).

Регулирующие влияния на Th0 осуществляют макрофаги, натуральные киллеры, тучные клетки и базофильные лейкоциты. Лимфокины, продуцируемые Th2, угнетают образование или действие лимфокинов, продуцируемых Th1, и наоборот. Поскольку атопия связана с преобладанием активности Th2, иммунные механизмы, реализующиеся при активации Th1 угнетаются. Возможно поэтому при атопии, особенно выраженной, достаточно часто выявляется недостаточность клеточного и гуморального звеньев иммунитета. В процессе развития сенсибилизации продуцирующиеся в повышенном количестве ИЛ-3 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) стимулируют превращение клеток

предшественников эозинофилов в эозинофилы, после чего под влиянием ИЛ-5 стимулируются процессы их пролиферации и дифференцировки. Th1-ответу способствует продукция гамма-интерферона (ИФ-γ), ИЛ-2 и ИЛ-12, которые одновременно ингибируют образование Th2-клеток. Th1-ответ стимулирует продукцию IgG и формирование T-клеточного иммунного ответа, Th2-ответ стимулирует продукцию IgE и формирование аллергии.

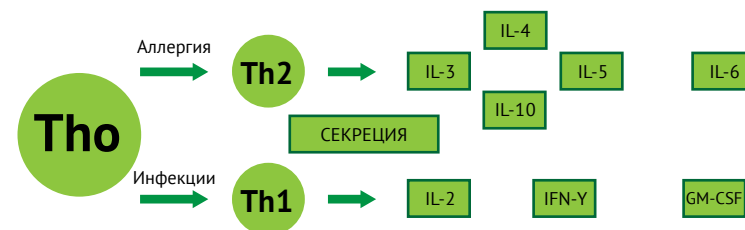


Рис. 7. Активация и дифференцировка T-хелперов нулевых (Th0) при аллергии и инфекциях.

Примечание: IL- интерлейкин; IFN-γ – интерферон-гамма; Th-T – лимфоциты хелперы; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

Для развития сенсибилизации важнейшее значение имеет доза аллергена. На малые дозы от 1 до 10 мкг макрофаги, как правило, не реагируют, и он представляется (презентируется) В-лимфоцитами Th2 (Т-лимфоциты хелперы 2 типа). В ответ Th2 увеличивают секрецию интерлейкина 4 (ИЛ-4), который стимулирует образование этих же клеток (Th2) и экспрессию рецепторов для интерлейкина 1 (ИЛ-1) на их поверхности, что повышает чувствительность Th2 к стимуляции. Кроме того, ИЛ-4 совместно с интерлейкином 5 (ИЛ-5) и интерлейкином 13 (ИЛ-13) переключают В-лимфоциты на синтез IgE, а не иммуноглобулинов класса G. Более высокие дозы аллергена редко вызывают сенсибилизацию, так как в этом случае аллерген представляется макрофагами и возникает им-

мунный ответ с активацией субпопуляции Th1 (Т-лимфоциты хелперы 1 типа).

Под влиянием ИЛ-4 увеличивается содержание Т и В клеток и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к IgE (Fcε RII), выражаемые с помощью моноклональных антител CD23. В соответствии с этим увеличивается уровень растворимого CD23 в крови, часто коррелирующий с увеличением содержания общего IgE.

Типичные изменения иммунограммы, которые возникают при аллергических заболеваниях:

- снижение абсолютного и относительного уровня Т-клеток (фенотип CD3+CD8+);
- изменение количества Т-хелперов (фенотип CD3+CD4+);
- повышение уровня активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR+, CD25+);
- изменение уровня цитокинов — повышение концентрации ИЛ-4 и ИЛ-5, снижение содержания гамма-интерферона;
- повышение уровней IgG, IgM, общего IgE;
- снижение фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов;
- повышение уровня катионного белка нейтрофилов;
- повышение уровня ЦИК.

Типичные изменения картины периферической крови при аллергических заболеваниях:

- повышение уровня лимфоцитов;
- повышение уровня лейкоцитов;
- повышение содержания белковых фракций;
- снижение уровня тромбоцитов и альбуминов;

- повышение СОЭ;
- повышение уровня эозинофилов.

Иммуноглобулины

Иммуноглобулины экспрессируются (представляются) на поверхности зрелых В-лимфоцитов и выполняют роль рецепторов антигенов. Циркулирующие (свободные) иммуноглобулины образуются плазматическими клетками.

Иммуноглобулины представляют собой гликопротеины, образованные 2 легкими (L) и 2 тяжелыми (H) аминокислотными цепями молекулярной массой 25 кДа и 50-70 кДа соответственно. Каждая цепь имеет неизменную (константную) часть и изменяющуюся (вариабельную) часть. Кристаллизующийся участок константной части носит наименование Fc-фрагмент. Цепи соединяются между собой цистеиновыми мостиками.

В зависимости от структуры тяжелых (H) цепей выделяют 5 классов иммуноглобулинов – IgM, IgG, IgA, IgD, IgE, из них иммуноглобулины классов IgG и IgA еще разделяют на подклассы. У человека выделяют 4 подкласса IgG – IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 2 подкласса IgA – IgA1 и IgA2.

Вариабельные области имеют около 110 аминокислот. Есть участки вариабельных областей с особенно частой изменчивостью аминокислот, такие участки цепей называют гипервариабельными. **Гипервариабельные участки отвечают за специфичность связывания антител с антигенами и аллергенами.** Замена единственной аминокислоты в таком участке критична для связывания определенного антигена (аллергена). В гипервариабельных участках антител формируются активные центры, за счет которых происходит связь антител с антигеном. Такие участки в функциональном плане обозначают как Fab (Fragment antigen binding).

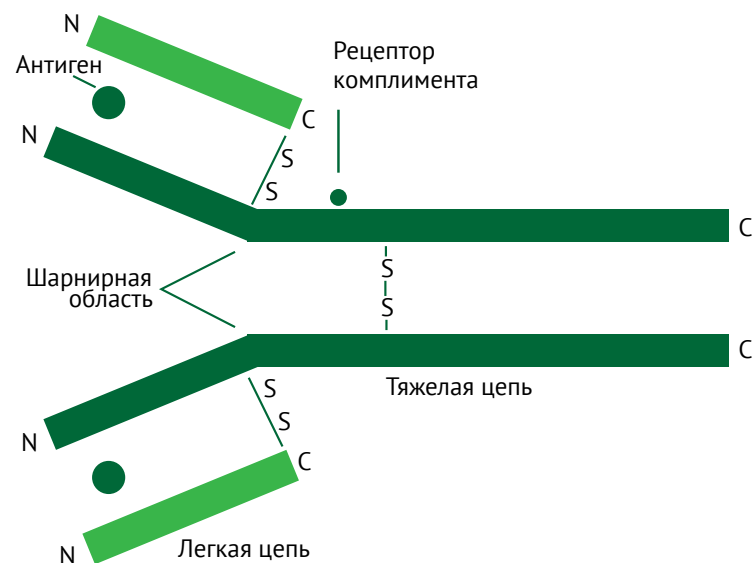


Рис. 8. Модель молекулы антитела.

Поскольку антиген может вызывать образование антител различных классов, то активные центры антител, например таких различных классов как IgG и IgE могут иметь сходные по строению (комплементарные антигену) активные центры. За счет этого антитела из различных классов могут соединяться с одним и тем же антигеном, что создает возможность формирования перекрестных реакций между ними *in vitro*. Для того, чтобы избежать такого типа реагирования, разработаны лабораторные технологии, основанные на выделении в начальном этапе исследования антител определенного класса (например, IgE), а только потом выявления среди них специфически реагирующих на аллерген (IgE специфических).

Константная область отвечает за способность антитела связывать комплемент и фиксироваться на клетках, имеющих

рецепторы (они носят название Fc-рецепторы) к этой части антител. Эти свойства антител называют эффекторными.

Иммуноглобулины, являясь соединением белков и углеводов (гликопротеинами), могут выступать в роли антигенов, быть иммуногенными для других индивидов и разных видов.

В переменных областях локализуются участки для специфического распознавания (реагирования) с антигеном, так называемые эпитопы. При наличии определенного эпитопа такие иммуноглобулины объединяют наименованием идиотип, т.е. имеющие эпитоп определенной специфичности. Эти эпитопы иммуноглобулинов имеют пространственную структуру, отражающую образ антигена, как бы «слепок». Эпитопы бывают линейными, т.е. образуются набором линейно-расположенных аминокислот и конформационными, образованными пространственно-сближенными частями белков иммуноглобулинов. Если подействовать на молекулу такого белка, например, денатурацией, то это вызовет исчезновение конформационного эпитопа и, как следствие, потерю возможности специфического реагирования с антигеном. Если же, например, у белкового антигена имеется конформационный эпитоп и линейный эпитоп, образованные одними и теми же аминокислотами, то им будут соответствовать 2 вида антител – к конформационному эпитопу и линейному эпитопу.

В связи с тем, что иммуноглобулины могут иметь не один эпитоп, то различают общие и частные идиотипы. **За счет существования общих идиотипов возможно перекрестное реагирование различных антител, в том числе IgG и IgE антител.** Наличие общих идиотипов характерно для антител к распространенным антигенам. Частные идиотипы иммуноглобулинов являются уникальными, т.е. формируют специфичность антител.

В основе реакции антиген-антитело лежит образование нековалентных химических связей (электростатических, водород-

ных, гидрофобных, сил Ван-дер-Ваальса) между эпитопом антигена и активным центром антитела. Явление пространственного соответствия эпитопа и активного центра носит название комплементарности. Явление связывания антигена и антитела обратимо, т.е. антитело и антиген могут разъединяться. Поскольку высокомолекулярные антигены могут иметь несколько эпитопов, то величину суммарной связи антител к этим эпитопам обозначают термином **авидность**. Ее определяют на основе силы, необходимой для разрыва иммунных комплексов, образованных соединением антител с несколькими эпитопами антигена.

IgE и его рецепторы

Основным участником иммунологической стадии аллергических реакций 1 типа является иммуноглобулин Е. Плазматические клетки, продуцирующие IgE, относятся к долгоживущим. Они сосредоточены преимущественно в лимфоидной ткани слизистых оболочек и лимфатических узлах, которые дренируют эти области (пейеровы бляшки, мезентериальные и бронхиальные лимфатические узлы) (рис. 9). Поэтому при первом (атопическом) типе аллергической реакции в первую очередь реагируют органы дыхания, кишечник и конъюнктива глаза. Молекулы IgE имеют сходное, с молекулами других иммуноглобулинов, в частности IgG или мономерами IgM. Он имеет константный фрагмент Fc (constant fragment), позволяющий IgE фиксироваться через соответствующие рецепторы на поверхности клеток. Другой конец молекулы – Fab (antigen-binding fragment), находящийся в вариабельной части молекулы иммуноглобулина Е, выполняет функцию связывания IgE с соответствующим аллергеном. IgE термолабилен, т.е. при нагревании в течение 4 ч при 56°C происходит его денатурация. При этом активные центры IgE теряют способность соединяться со специфическими антигенными детерминантами, а целая молекула – сенсibilизировать ткани и кожу.

Преимущественное	Редкое
<ul style="list-style-type: none"> • в слизистых тканях: в слизистой бронхов и бронхиол, желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря; • в миндалинах и аденоидной ткани; • наиболее высокие концентрации в полипозной ткани. 	<ul style="list-style-type: none"> • селезенка, печень, региональные лимфатические узлы, а также в периферической крови.

Рис. 9. Плазматические клетки-продуценты IgE и их представительство в тканях.

Все иммуноглобулины класса IgE составляют в совокупности общий IgE, который называется так потому, что включает в себя все антитела класса Ig E различной специфичности к разнообразным антигенам и аллергенам. Единицы измерения концентрации IgE: согласно ВОЗ 1 МЕ/мл IgE соответствует весовой концентрации 2,4 нг/л. (МЕ – международная единица, в англоязычной литературе обозначается как IU/mL – Интернациональная единица в соответствии с требованиями Second Reference Preparation of IgE (ВОЗ).

В периферической крови IgE могут находиться либо в свободном состоянии либо в виде комплексов IgG (анти-IgE): IgE. Если в сенсibilизированный организм повторно поступает аллерген, то он может быть связан IgE-антителами, как циркулирующими, так и фиксированными на клетках (аллерген образует мостики между фиксированными на клетках IgE-антителами). В зависимости от количества соединенных аллергеном IgE-антител, дозы аллергена и ряда других условий произойдет либо торможение активности клетки, либо ее иммунологическая активация и переход процесса в патохимическую стадию. Моновалентные (имеющие один эпитоп) аллергены, связываясь только с одним участком IgE-антитела, не вызывают активации клетки и более

того, сами препятствуют действию мультивалентных (имеющих несколько эпитопов) аллергенов.

Наиболее важной особенностью иммуноглобулина Е является способность прочно фиксироваться Fc-фрагментом к рецепторам тканевых базофилов, базофилов крови и эозинофилов. Зарегистрировано несколько функционально отличных изоформ IgE (по разным источникам от 2 до 4), причем обязательны две: первая от лиц с atopическими заболеваниями (способна повышать чувствительность базофилов человека к действию эндогенных гистамин-высвобождающих факторов) и вторая от практически здоровых людей, лишенная таких свойств. Возможно, этим и объясняется протекание биохимических процессов на ином уровне, чем в нормальных физиологических условиях.

При развитии иммунного ответа по I типу продуцируемые В-лимфоцитами IgE сначала сенсибилизируют тучные клетки рядом с местом продукции, а после проникновения в кровь связываются посредством Fc-фрагментов с FcεR рецепторами циркулирующих базофилов и тканевых тучных клеток организма. При встрече аллергена с сенсибилизированной тучной клеткой или базофилом, аллерген перекрестно связывается с 2 молекулами IgE, фиксированными на поверхности, приводя к повышению внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и выделению медиаторов аллергической реакции: ранее синтезированных – гистамина, протеаз; вновь синтезированных – лейкотриенов, простагландинов, а также цитокинов, усиливающих воспалительную реакцию и IgE-ответ. Дегрануляция тучных клеток и базофилов может индуцироваться не только в ответ на взаимодействие IgE и аллергена, но и на другие факторы, например – C2, C3, C4 компоненты комплемента, которые продуцируются в ходе альтернативного (участвуют C3, C5 – компоненты комплемента и антитела IgG4 субкласса) или классического (участвуют C2, C3, C4 – компоненты, а также антитела IgG1, IgG2, IgG3 субклассов) путей его активации. Поэтому у больных, например ангионевро-

тическим отеком (АО), имеющийся дефицит C1-ингибитора комплемента, приводит к нерегулируемой активации всей системы комплемента и формированию реакции аллергического типа. Лабораторная диагностика АО, следовательно, должна включать обязательное определение C1-ингибитора, уровней C1q, C4 компонентов комплемента.

IgG-опосредованные реакции гиперчувствительности

Сенсибилизирующая активность сыворотки крови человека связана не только с IgE, но и с IgG антителами, однако вклад в развитие аллергии IgG-антител значительно меньше. IgG антитела значительно слабее фиксируются на клетках-мишенях, и потому быстрее удаляются с их поверхности, поэтому сенсибилизация в этих условиях слабее, более сходная с образованием обычных иммунных комплексов аллерген-IgG-антитела. Этот вид иммунного ответа более характерен для пищевой и некоторых видов лекарственной аллергии. IgG-зависимые реакции повреждения клеток-мишеней (гиперчувствительность II и III типа по приведенной классификации) обусловлены взаимодействием антител либо иммунных комплексов с компонентом и различными эффекторными клетками. При этом реакция протекает либо по альтернативному, либо по классическому пути активации комплемента. Эффекторные клетки реакций: киллерные клетки, тромбоциты, нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, макрофаги/моноциты. В качестве антигена обычно выступают лекарства, фрагменты неполного катаболизма пищевых продуктов, консерванты и др. Эти антигены (например, большинство лекарственных препаратов) могут активировать эффекторные клетки как при участии IgG определенного субкласса и компонентов комплемента – C3a и C5a, так и самостоятельно, действуя по независимым механизмам.

Возможны следующие механизмы повреждения клеток-мишеней, опосредованные IgG:

1. Антительный

Этапы:

- а) Адсорбция антигена на *поверхности клеточных мембран*.
- б) Связь циркулирующих антител с антигеном сорбированным на клетках.

Образованные к антигену антитела (субклассов IgG1, IgG2, IgG3), циркулирующие в крови, связываются с антигенами сорбированными на клетках.

- в) Комплемент-опосредованный лизис клеток за счет активации системы комплемента по классическому пути.

2. Иммунокомплексный

Иммунные комплексы антитело-антиген-антитело адсорбируются на эффекторных клетках. Они взаимодействуют с системой комплемента, способствуя образованию компонентов C3a и C5a. Повреждение обусловлено комплемент-опосредованным лизисом эффекторных клеток.

Эффекторные функции E и G - изотопов иммуноглобулинов

- IgG1, IgG2 - классический путь высокой активации комплемента;
- IgG3 - менее эффективная активация комплемента по классическому пути;
- IgG4 - альтернативный путь активации комплемента;
- IgGE - не активируют комплемент.

Рис. 10. Эффекторные функции E и G-изотипов иммуноглобулинов

Медиаторы аллергии

Мы уже выяснили, что второй стадией аллергических реакций является патохимическая. Во второй стадии происходит активация клеток-эффекторов и высвобождение разнообразных медиаторов, что приводит к третьей (патофизиологической) стадии аллергической реакции (реакции органов и систем), раз-

витие которой характеризуется типичными клиническими проявлениями, обусловленными воздействием медиаторов, в виде аллергической сыпи, спазмов и отека бронхов вплоть до развития удушья и т.п. Таким образом, клиническая роль медиаторов состоит в том, что они формируют важнейшие симптомы аллергических заболеваний – сыпь, зуд, спазм бронхов, слезотечение и насморк.

Медиаторы – биологически активные вещества, выделяющиеся из клеток-мишеней. После иммунного взаимодействия с аллергеном (в первую стадию) кого-либо из участников 4 основных типов аллергических реакций (иммуноглобулины классов E, M и G, сенсibilизированные лимфоциты) происходит активация клетки-мишени аллергии, заканчивающаяся выделением медиаторов.

Гистамин – гетероциклический биогенный амин. В крови здоровых людей большая часть гистамина содержится в гранулах тучных клеток и базофильных лейкоцитов (около 1 пг в одной клетке) в готовом для выделения виде, количество гистамина в тромбоцитах в несколько тысяч раз меньше. У взрослых людей нормальное содержание гистамина в крови колеблется от 200 до 700 нмоль/л, в плазме – от 0 до 45 нмоль/л. Определение гистамина в цельной крови не позволяет судить об его участии в патогенезе, т. к. концентрация гистамина в крови может увеличиваться в сотни раз без проявлений его биологического эффекта.

Гепарин – макромолекулярный кислый протеогликан (ММ=750 000). Активируется после высвобождения из тучных клеток. Обладает низкой антикоагулянтной активностью и устойчивостью к протеолитическим ферментам, антитромбиновой и антикомплемментарной активностью. Один из важных компонентов, влияющий на работу свертывающей системы крови.

Серотонин – биогенный гетероциклический амин. Наибольшее значение этот медиатор имеет в патогенезе аллергических реакций у крыс, мышей, кроликов и меньшее – у морских свинок и человека. Развитие аллергических реакций у человека достаточно часто сопровождается изменениями содержания серотонина, в связи с чем, отмечена эффективность применения в таких случаях антисеротониновых препаратов, особенно при мигрени, крапивнице, атопическом дерматите.

Тромбоцитактивирующий фактор (ТАФ) является смесью глицеро-фосфохолинов, секретируемых в результате активации фосфолипазы А базофилами, лимфоцитами, нейтрофилами, тромбоцитами и эндотелиальными клетками. ТАФ вызывает агрегацию тромбоцитов и освобождение из них гистамина и серотонина, способствует хемотаксису, агрегации и секреции гранулярного содержимого эозинофилов и нейтрофилов, вызывает спазм гладких мышц и повышение проницаемости сосудов. ТАФ является важнейшим медиатором в развитии обострения бронхиальной астмы и анафилаксии, реакций воспаления и тромбообразования.

Хемотаксические факторы эозинофилов (ХФЭ) – группа пептидов различной молекулярной массы, основным биологическим действием которых является эффект хемотаксиса эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов, блокирование их реакции на другие хемотаксические стимулы.

Ферменты эозинофилов: арилсульфатазы, фосфолипаза D, гистаминаза, катионные белки гранул и некоторые другие.

Арилсульфатазы – ферменты, относящиеся к гидролазам сульфэфиров. Обнаружено 2 типа арилсульфатаз – А и В, различающихся по заряду молекул, электрофоретической подвижности изоэлектрическим точкам. В эозинофилах содержание арилсульфатаз примерно в 8 раз больше, чем в нейтрофилах.

Катионные белки гранул эозинофилов – совокупность катионных белков эозинофилов, содержащихся в гранулах. Зрелые эозинофилы содержат четыре главных белковых компонента. К ним относятся: главный белок со свойствами основания (major basic protein – MBP), катионный белок эозинофилов (eosinophil cationic protein – ECP), пероксидаза эозинофилов, и нейротоксин эозинофильного происхождения (eosinophil derived neurotoxin – EDN) или белок Х эозинофилов. На их долю приходится 90% содержимого всех белковых гранул эозинофилов. Основной биологической функцией ферментов данной группы является разрушение личинок гельминтов. Однако у больных бронхиальной астмой они также участвуют в развитии поздней фазы аллергической реакции и могут вызывать повреждение многорядного цилиндрического эпителия слизистой оболочки бронхов в виде десквамации и деструкции реснитчатых клеток, участвовать в активации комплемента и стимулировать освобождение гистамина тучными клетками и базофилами.

Эозинофильный катионный белок (ЭКБ). Эозинофильный катионный белок (ЭКБ) – положительно заряженный и обладающий основными свойствами протеин, входящий в состав цитоплазматических гранул эозинофилов. Молекулярная масса ЭКБ составляет 18-21 кДа. Эозинофильному катионному белку принадлежит особая роль в патогенезе аллергии. Этот, строго специфичный для эозинофилов белок, секретируется при иммунном ответе на паразиты (гельминты, шистосомы), а также при других аллергических и воспалительных реакциях. Выброс ЭКБ стимулирует секрецию слизи в бронхах, тормозит пролиферацию Т-лимфоцитов, связывает и нейтрализует гепарин. ЭКБ попадает в кровоток при дегрануляции эозинофилов и его уровень отражает степень выраженности этого процесса, возрастая в крови больных аллергическими заболеваниями (бронхиальная астма, атопический дерматит, популезная эритема), а также при гельминтозах.

Протеазы тучных клеток включают: триптазу, химазу, карбоксипептидазу А и катепсин-О-подобный энзим. Триптаза является сериновой протеазой и важнейшим компонентом гранул тучных клеток. Она может разрушать некоторые компоненты внеклеточного матрикса – коллаген, фибронектин, освобождать кинины, вызывать разрушение некоторых нейропептидов. Химаза тучных клеток расщепляет белки и активирует ряд протеаз, стимулирующих клетки, секретирующие слизь. В результате оба фермента (триптаза и химаза) повышают проницаемость микрососудов и аккумуляцию гранулоцитов. Подтверждено участие этих ферментов в патогенезе бронхиальной астмы, поскольку они обнаруживаются в повышенных концентрациях в бронхоальвеолярной жидкости у больных, особенно в фазу обострения.

Определение медиаторов имеет в настоящее время диагностическое значение. Так, выявление уровня триптазы может быть использовано для дифференциальной диагностики лекарственной аллергии, при которой ее уровень существенно возрастает в первые часы реакции. Уже сегодня выявление повышенного уровня эозинофильного катионного белка служит маркером активации хронического аллергического воспаления, например, при атопической бронхиальной астме. В будущем определение у больных аллергией разнообразных медиаторов несомненно будет расширяться и может быть использовано как в целях диагностики, в том числе дифференциальной, так и в целях мониторинга.

4. Методы диагностики аллергических заболеваний

Лабораторная диагностика аллергических заболеваний является одним из частных разделов диагностики заболеваний иммунной системы. В России методология лабораторной диагностики заболеваний иммунной системы была впервые разработана Р.В. Петровым и соавторами в 1984 году. Ее принципы были изложены в опубликованных тогда же методических рекомендациях «Оценка иммунного статуса человека», определявших объем и методы иммунодиагностики. В соответствии с данным документом все тесты подразделялись на 2 уровня. Тесты 1 уровня были направлены на выявление первичных нарушений иммунной системы – первичных иммунодефицитов, а тесты 2 уровня – на углубленное изучение функционального состояния различных клеток иммунной системы (определение функций Т- и В-лимфоцитов в реакции бласттрансформации с антигенами и митогенами, способности к синтезу цитокинов).

Современный период характеризуется внедрением особых документов - протоколов, определяющих перечень и порядок обследования и лечения больных в соответствии с нозологической формой их заболевания.

В настоящее время основным действующим документом, является Приказ от 7 ноября 2012 г. N 606н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи населению по профилю «Аллергология и иммунология». Данным приказом утверждены: правила организации деятельности кабинета врача аллерголога-иммунолога; рекомендуемые штатные нормативы кабинета врача аллерголога-иммунолога; стандарт оснащения кабинета врача аллерголога-иммунолога; правила организации деятельности дневного стационара аллергологии и иммунологии; рекомендуемые штатные нормативы дневного стационара аллергологии и иммунологии; стандарт оснащения дневного

стационара аллергологии и иммунологии; правила организации деятельности отделения аллергологии и иммунологии; рекомендуемые штатные нормативы отделения аллергологии и иммунологии; стандарт оснащения отделения аллергологии и иммунологии.

Диагностика аллергических заболеваний проводится в несколько этапов:

- сбор аллергологического анамнеза;
- общее клинико-лабораторное обследование;
- специфическая клиническая аллергодиагностика (проведение кожных аллергических проб и/или провокационных тестов с аллергенами);
- аллергологическое и иммунологическое лабораторное обследование.

4.1. Сбор аллергологического анамнеза

Схема сбора аллергологического анамнеза, используемая в нашей стране, была впервые разработана в НИИАЛ АМН СССР под руководством академика А.Д. Адо. Обследование пациента начинают с анализа его жалоб и сбора анамнеза аллергического заболевания (АЗ), который подразумевает сбор сведений, полученных не только со слов пациента, но и анализ медицинской документации: данных амбулаторной карты больного, выписок из стационаров и т.д.

Общая схема сбора аллергологического анамнеза:

- АЗ в семье: у отца и его родственников, у матери и её родственников, у братьев и сестёр, у детей пациента;
- перенесённые ранее АЗ (перечислить);
- реакции на введение различных лекарств (какие, когда);

- реакции на введение сывороток и вакцин (какие, когда);
- сезонность и влияние климата на течение заболевания;
- влияние погоды и физических факторов (охлаждение, перегревание и т.д.);
- влияние физических нагрузок, отрицательных эмоций;
- связь с простудными заболеваниями (верхних дыхательных путей, ангинами, бронхитами, пневмониями и др.);
- связь заболевания с менструацией, кормлением ребёнка, беременностью, родами;
- где и когда чаще возникают приступы болезни (или ухудшение состояния): дома, на работе, на улице, в загородной зоне, днём, ночью;
- влияние на течение заболевания различных пищевых продуктов, напитков, алкоголя, косметических средств, инсектицидов, пыли, запахов, контакта с различными животными, одеждой, постельными принадлежностями;
- жилищная обстановка: дом каменный или деревянный, отопление, уровень влажности, ковры, мягкая мебель, книги, спальные принадлежности, животные, аквариумные рыбки и др.;
- наличие клинического эффекта от применения антиаллергических средств.

Сбор аллергологического анамнеза имеет основную цель – выявление фактов, свидетельствующих об аллергической природе заболевания данного пациента.

Для реализации данной цели решаются следующие задачи:

1. установление наследственной предрасположенности к аллергическим заболеваниям;

2. выявление перенесенных ранее аллергических заболеваний и реакций;
3. определение основных клинических симптомов и синдромов болезни, эффективности антиаллергических средств, наличия или отсутствия сезонности заболевания, эффекта элиминации;
4. определение круга аллергенов, наиболее вероятно участвующих в реализации аллергического заболевания пациента, для чего проводится:
 - выявление анамнестических данных об аллергических реакциях в прошлом и вероятных аллергенах их реализовавших;
 - выявление профессиональных, бытовых, медицинских (лекарства) условий контакта с потенциальными аллергенами.
5. формулировка «анамнестического» предварительного диагноза.

Сбор аллергологического анамнеза должен проводиться очень тщательно, с учетом особенностей клинической картины заболевания. При этом роль симптомов для каждого вида патологии различна. Важнейшими данными являются также те, что детализируют различные стороны образа жизни и профессии больного.

Приведем анамнестические и клинические особенности нескольких форм аллергии.

Особенности анамнеза при бытовой аллергии:

- наличие эффекта элиминации (уменьшение или исчезновение симптомов болезни) при прекращении бытового контакта с аллергенами;
- обострение в холодное время года (увеличение численности

клещей, ухудшение проветривания, возрастание времени контакта);

- наличие ночных симптомов болезни (контакт с постельными принадлежностями);
- возникновение симптомов во время уборки, ремонта, посещения запыленных помещений.

Особенности анамнеза при эпидермальной аллергии:

- возникновение симптомов при контакте с животными (птицами);
- реакции возникают после контакта с изделиями из шерсти животных (пером и пухом птиц);
- аллергические реакции на введение препаратов, содержащих животные белки (сыворотки, иммуноглобулины и т.п.).

Особенности анамнеза при пыльцевой аллергии:

- сочетание нескольких клинических форм – ринит+астма, ринит+конъюнктивит, ринит+конъюнктивит+астма;
- сезонность заболевания, связанная с периодом пыления растений (весна, лето или осень);
- метеозависимость (ухудшение самочувствия в сухую ветреную погоду), обусловленная улучшением условий для распространения пыльцы растений;
- перекрестная пищевая сенсibilизация с аллергенами пыльцы растений (например: яблоко – пыльца березы);
- аллергические реакции на фитопрепараты.

Особенности анамнеза при пищевой аллергии:

- наличие «диатеза» в детском возрасте;
- появление или усиление симптомов заболевания в связи с приемом пищи;
- высокая (более 90%) частота поражений кожи;

- сочетание аллергических поражений кожи (дерматит, крапивница) и органов дыхания (ринит, астма);
- наличие хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта (гастрит, холецистит, колит, панкреатит, язвенная болезнь).

Особенности анамнеза при лекарственной аллергии:

- аллергические реакции на лекарства у кровных родственников;
- развитие реакций на препарат, который больной получал ранее;
- возникновение реакций через 7-9 дней после начала приема препарата (периода сенсибилизации);
- сочетанный прием нескольких (многих) лекарственных препаратов;
- наличие грибковых заболеваний;
- наличие профессионального контакта с лекарствами;
- реакции на введение вакцин, сывороток;
- реакции кожи при контакте с лекарственными средствами (мази, кремы и т.п.).

4.2. Общее клинико-лабораторное обследование

Клинический осмотр. Проводят осмотр больного и назначают исследование крови, мочи, носового секрета, мокроты, рентген грудной клетки, околоносовых пазух, определяют наличие и степень обструкции дыхательных путей. Физикальное обследование проводят по стандартной схеме, начиная с осмотра, а также применения таких приёмов, как пальпация, перкуссия, аускультация и тонометрия, которые позволяют оценить общее состояние пациента, выявить характер и распространённость

поражения кожи и слизистых оболочек, а также обнаружить нарушения функций внутренних органов и систем и оценить степень выраженности изменений.

Общеклинические лабораторные исследования:

- клинический анализ периферической крови;
- общий анализ мочи;
- биохимический анализ крови (билирубин, АЛТ, АСТ, мочевины, глюкоза и др.);
- определение белковых фракций в сыворотке крови;
- цитологические исследования (отделяемое носа, глаз, мокроты, жидкость бронхо-альвеолярного лаважа и др.).

По результатам анамнестического и общеклинического этапов обследований можно установить:

- локализацию процесса в органах и тканях (нос, глаза, кожа, бронхи, желудочно-кишечный тракт);
- нозологическую форму (поллиноз, бронхиальная астма, дерматит);
- степень выраженности (легкая, средняя, тяжелая) и фазу заболевания (острая фаза или ремиссия).

Диагностику и лечение аллергических заболеваний проводит врач аллерголог-иммунолог. Однако при проведении дифференциальной диагностики, а также для выявления осложнений и их лечения в ряде случаев необходимы консультации других специалистов — дерматолога, риноотоларинголога, пульмонолога, ревматолога и др.

4.3. Клинические методы специфической диагностики аллергических заболеваний (аллергодиагностика *in vivo*)

Элиминационный тест

Цель тестирования — определение причинной значимости аллергена в развитии симптомов заболевания. Тест основан на оценке состояния пациента после прекращения контакта с аллергеном. Чаще всего метод применяют при обследовании на наличие пищевой и лекарственной аллергии, но он может быть использован и при выявлении других видов аллергии.

Кожные тесты

Одним из основных клинических методов специфической диагностики аллергических заболеваний является кожное аллергологическое тестирование. Выделяют его виды: накожные (капельные, аппликационные и др.), скарификационные, тест-уколом (prick-тест), внутрикожные. Выбор вида кожной пробы зависит от предполагаемой этиологии заболевания, степени сенсибилизации больного. Показаниями для проведения кожных проб являются данные анамнеза, указывающие на роль того или иного аллергена (или группы аллергенов) в генезе заболевания. Выбор вида кожной пробы зависит от предполагаемой этиологии заболевания, а также вероятной степени сенсибилизации больного.

Кожное аллергологическое тестирование может проводиться только аллергологом-иммунологом, владеющим методикой выполнения данной процедуры, в условиях специализированного аллергологического стационара или кабинета. Несмотря на недостатки кожного аллергологического тестирования, его по праву считают специфичным, информативным и доступным. Наиболее часто оно используется для определения спектра сенсибилизации у пациентов с atopическими заболеваниями,

а также выявления сенсибилизации к бактериальным аллергенам. Для проведения кожного тестирования используют только стандартизированные диагностические аллергены, разрешённые к применению в России. Скарификационные и prick-тесты (от англ. prick — «укол») выполняют с бытовыми, эпидермальными, пыльцевыми, грибковыми, пищевыми, инсектными, а также латексными аллергенами. Внутрикожное тестирование проводят бактериальными, грибковыми, инсектными аллергенами. Ряд авторов предлагают использовать кожные тесты для специфической аллергологической диагностики лекарственной аллергии. Однако, достоверность кожных тестов с лекарственными средствами ограничена, в частности, из-за того, что истинным аллергеном нередко выступает не исходный препарат, а его метаболиты или конъюгаты с белками. В настоящее время стандартизованные тест-системы для кожного тестирования с лекарственными аллергенами в России не производятся.

Противопоказания к проведению кожного тестирования:

- обострение аллергического заболевания;
- тяжёлое декомпенсированное течение БА (на фоне адекватно проводимого лечения объем форсированного выдоха за первую секунду < 70%);
- острые интеркуррентные инфекционные заболевания (респираторные заболевания, ангина, пневмония и др.);
- декомпенсация заболеваний внутренних органов (печени, почек, органов кровеносной и эндокринной систем, крови);
- обострение хронических инфекционных заболеваний (туберкулёза, сифилиса, бруцеллёза и др.);
- аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка, склеродермия, ревматоидный артрит, дерматомиозит) в стадии обострения;
- первичные иммунодефициты;

- в анамнезе — возникновение анафилактического шока при проведении кожного аллергологического тестирования;
- злокачественные новообразования;
- психические заболевания, при которых невозможен контакт с пациентом;
- беременность и лактация;
- синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД).

Достоинства кожного аллергологического тестирования: доступность, специфичность, наглядность, низкая стоимость.

Недостатки: субъективность при оценке результатов, возможность проведения тестирования только в период ремиссии заболевания, необходимость отмены ряда противоаллергических средств перед исследованием, непосредственный контакт с аллергеном и риск развития нежелательных реакций, ограниченное количество тестов, которые можно выполнить одномоментно, а также наличие противопоказаний

Несмотря на упомянутые недостатки кожного аллергологического тестирования, его до сих пор по праву считают специфичным, информативным и доступным. Наиболее часто оно применяется для выявления сенсibilизации у пациентов с atopическими заболеваниями, а также сенсibilизации к бактериальным аллергенам. Для проведения кожного тестирования вводят только стандартизированные диагностические аллергены, разрешённые к применению, чаще всего используя скарификационный метод и prick-тест.

Возможные причины низкой информативности результатов кожных тестов:

- относительно низкая специфичность скарификационных тестов. Поскольку скарификационные пробы имеют наиболее низкую специфичность среди кожных тестов, в ряде согласи-

тельных документов их не рекомендуют для использования.

- возможность ложно-отрицательных и ложно-положительных результатов кожного тестирования.

Внутрикожные тесты

Постановку внутрикожных проб используют для выявления сенсibilизации к аллергенам бактериального и грибкового происхождения. Тесты проводят со стандартизированными лечебно-диагностическими бактериальными и грибковыми аллергенами.

Результаты тестов оценивают через 15-20 мин, а затем через 24, 48 или 72 ч.

Аппликационные (patch-) тесты

Проводят у пациентов с развитием контактных реакций. Аппликационный тест предпочтительнее проводить с использованием стандартизированных наборов (клеящие вещества, ЛС местного действия, красители, металлы, компоненты резины и другие вещества).

К достоинствам теста относится возможность проведения с его помощью дифференциальной диагностики аллергического и неаллергического контактного дерматита, выявление профессиональных контактных аллергических заболеваний, аллергии к латексу. К недостаткам теста относятся следующие: возможность его постановки не ранее 1 месяца после возникновения острого контактного дерматита (в фазу ремиссии), низкая специфичность и небезопасность с его помощью выявления лекарственных и латексных аллергенов.

Кожный тест на аутоиммунную крапивницу. Кожный тест с аутологичной сывороткой крови проводят при подозрении на аутоиммунную крапивницу. Пробу выполняют в период обострения заболевания. За 48 ч до постановки кожной пробы

отменяют блокаторы H1-рецепторов гистамина, за 10 суток - трициклические антидепрессанты. Достоинством теста является возможность лабораторного подтверждения аутоиммунного механизма развития крапивницы. Недостатками теста являются относительно низкая специфичность и чувствительность, необходимость отмены лекарственных средств.

Провокационные тесты

Конъюнктивальный тест. Провокационные конъюнктивальные тесты с аэроаллергенами проводят для уточнения диагноза аллергического конъюнктивита (АК) при возникновении противоречий между данными анамнеза и результатами других методов диагностики.

В конъюнктивальный мешок закапывают тест-контрольную жидкость. При отсутствии реакции в другой конъюнктивальный мешок последовательно закапывают по 1 капле раствора, концентрацию аллергена в котором увеличивают в 2 раза

Назальный тест. Назальный провокационный тест проводят при наличии противоречий между данными анамнеза, указывающими на возможность развития аллергического ринита, и результатами других методов диагностики, при множественной сенсibilизации к различным аллергенам и необходимости выбора ведущего аллергена для проведения специфической иммунотерапии (СИТ).

В одну половину носа закапывают 1 каплю тест-контрольной жидкости. При отсутствии какой-либо реакции в другую половину последовательно закапывают по 1 капле аллергена в разведении 1:100 и 1:10, затем цельный аллерген. Тест считают положительным при выявлении симптомов ринита.

Ингаляционный тест. Ингаляционный провокационный тест позволяет выявить специфическую чувствительность пациента, проявлением которой служит бронхиальная обструкция, воз-

никающая при воздействии определённого аллергена. Тест используют редко и проводят при бронхиальной астме только в межприступный период. Если позволяет состояние пациента, за сутки до исследования отменяют бронходилататоры, препараты хромоглициевой кислоты, агонисты β_2 -адренорецепторов, блокаторы H1-рецепторов гистамина. Проведение теста начинают с ингаляции контрольной жидкости (изотонического раствора натрия хлорида) с последующей регистрацией показателей функции внешнего дыхания (ФВД). При отсутствии субъективного ухудшения состояния и изменений ФВД приступают к проведению теста с аллергеном.

Провокационную пробу начинают с наименьшей концентрации аллергена 1:1 000 000. Затем концентрацию аллергена последовательно увеличивают: За одно исследование можно провести пробу только с одним аллергеном.

Тест торможения естественной миграции лейкоцитов in vivo (ТТЕЭЛ) по А.Д. Адо успешно применяют более 25 лет. Тест был разработан для диагностики лекарственной аллергии к антибактериальным препаратам (кроме тетрациклина), сульфаниламидам, местным анестетикам, нестероидным противовоспалительным средствам (НПВС). За указанный период метод показал высокую достоверность и безопасность.

Подъязычный и пероральный тесты. Подъязычный и пероральный тесты с лекарствами проводят только по строгим показаниям и соблюдением условий для провокационного аллергологического тестирования.

Провокационные тесты с ацетилсалициловой кислотой. Провокационный дозируемый тест проводят при подозрении на аспириновую БА и только той группе пациентов, которым НПВС жизненно необходимы для лечения сопутствующих заболеваний.

При тестировании ацетилсалициловую кислоту применяют внутрь с последующим мониторингом показателей бронхиальной проходимости.

Для диагностики аспириновой БА также используют плацебо-контролируемый провокационный тест с ацетилсалициловой кислотой или аспириновый провокационный тест с одновременным определением уровня лейкотриенов (ЛТ) в моче.

Оральный тест с пищевыми аллергенами. Тест применяют для диагностики пищевой аллергии (ПА). За 2 недели до проведения теста назначают элиминационную диету с исключением предполагаемого причинного пищевого продукта. При хорошем общем самочувствии пациент проглатывает утром натощак желатиновую капсулу, содержащую 8 мг пищевого аллергена. В течение 24 ч оценивают все изменения в состоянии пациента. Если симптомы аллергии отсутствуют, то тест повторяют через сутки, при этом дозу аллергена увеличивают до 20 мг. В дальнейшем тест повторяют ещё через сутки, удваивая дозу аллергена, доводя её до 8 000 мг, что соответствует 100 г исходного пищевого продукта. Если и после введения 8 000 мг пищевого аллергена реакции не наступает, то считают, что у пациента нет аллергии на испытуемый продукт, и тест прекращают. В качестве пищевого аллергена используют сухие или лиофилизированные пищевые продукты: сухое молоко, яичный порошок, муку, орехи, мясо и др. Маленьким детям пищевой аллерген добавляют в питание. Схема проведения такая же, но доза аллергена составляет $\approx 2\,000$ мг.

Двойной слепой плацебо-контролируемый провокационный тест с пищевым аллергеном. За 2 недели до проведения теста назначают элиминационную диету с исключением предполагаемого аллергенного продукта. При хорошем общем самочувствии утром натощак пациент проглатывает капсулу, содержащую 125-500 мг пищевого аллергена или плацебо (при этом ни

врач, ни пациент не знают, что содержит капсула). Каждые 15-60 мин. дозу исследуемого вещества удваивают, доводя её до 10 г. Если реакция не наступила, то тест считают отрицательным. При отсутствии реакции и установлении, что в качестве испытуемого образца пациент принимал плацебо, тест повторяют с пищевым продуктом. Провокационные тесты с пищевыми аллергенами не назначают пациентам, у которых по данным анамнеза была тяжёлая аллергическая реакция на пищевой продукт.

Провокационные тесты имеют большое диагностическое значение, однако применение их ограничено в связи с явной опасностью для больного. Доказано, что даже минимальное количество, например, латексного аллергена, достаточно для возникновения тяжелых системных реакций, в связи с чем до настоящего времени провокационные тесты не приняты в качестве «золотого стандарта» диагностики латексной аллергии. В связи с повышенным риском системных реакций основное условие проведения провокационного аллергологического тестирования следующие: все провокационные тесты (*in vivo*) проводит только аллерголог-иммунолог, владеющий методикой выполнения данной процедуры в условиях специализированного аллергологического стационара или кабинета, с необходимым набором средств неотложной помощи.

Преимущества и недостатки *in vivo* методов аллергодиагностики

*Преимущества *in vivo* методов специфической аллергодиагностики:*

- быстрота получения результата,
- наглядность для пациента,
- относительно низкая стоимость.

Недостатки in vivo методов специфической аллергодиагностики:

- невозможность проведения исследований при остром инфекционном заболевании, в периодах обострения или декомпенсации хронических инфекционных или аутоиммунных заболеваний, у больных злокачественными новообразованиями и приобретенными иммунодефицитами (в том числе СПИДом), при беременности и лактации;
- субъективный (визуальный) характер оценки и интерпретации результатов кожных тестов;
- полуколичественный (в крестах) способ регистрации результатов;
- риск возникновения первичной (к новому аллергену) сенсибилизации;
- риск провокации (обострения) аллергического заболевания, возможность развития побочных (в том числе психосоматических) эффектов;
- отсутствие единых (по методике ВОЗ) стандартов контроля качества;
- необходимость ограничения или отмены терапии (в том числе гормональных или антигистаминных препаратов) за несколько дней до проведения обследования;
- необходимость, в ряде случаев, нескольких этапов диагностики (аллергометрическое титрование; смена видов тестов, например, прик-теста на внутрикожный);
- возможность развития неспецифических реакций кожи (ангионевротический отек), затрудняющих правильную оценку результата;
- выявление при одном обследовании ограниченного числа аллергенов;

- необходимость исключения из диагностируемого перечня аллергенов, вызвавших системные реакции (анафилактический шок) при ранее проводимом кожном тестировании;
- необходимость специальных условий для обследования специализированного аллергологического кабинета (стационара) и специалиста-аллерголога;
- необходимость обеспечения средствами неотложной терапии процедуры кожного и провокационного тестирования.

4.4. Лабораторные методы специфической диагностики аллергических заболеваний (аллергодиагностика in vitro)

Лабораторные методы дополняют клинические методы специфической диагностики аллергии. Иногда лабораторные методы могут использоваться на первичном этапе диагностики, в случаях, когда постановка прямых кожных проб невозможна или опасна – при наличии обострения кожного аллергического процесса (атопического дерматита, крапивницы, псориаза), в период обострения бронхиальной астмы или поллиноза, при невозможности отмены антигистаминных препаратов, после перенесенного в прошлом анафилактического шока и ряде других состояний.

Таким образом, использование специфических методов лабораторной диагностики аллергии показано в следующих случаях:

- при наличии противопоказаний к проведению кожных проб (обострение основного заболевания; острые инфекционные заболевания; нервные и психические заболевания; декомпенсированные состояния при болезнях сердца, печени, почек и системы крови; вскоре после острой аллергической реакции; в период лечения гормонами, бронхоспазмолитиками

- и антигистаминными препаратами и в ряде других случаев);
- для дифференциальной диагностики субклинической сенсibilизации и ложно-положительного результата кожной реакции;
 - для дифференциальной диагностики положительного и ложно-положительного, а также отрицательного и ложно-отрицательного результатов кожного тестирования;
 - во всех случаях, когда показана реакция Прауснитца-Кюстнера, но нет реципиента или реальна опасность переноса инфекционного заболевания.

Высокая информативность методов специфической лабораторной диагностики аллергии, безопасность и простота выполнения позволяют рекомендовать их для широкого использования, особенно при аллергологическом обследовании детей.

Одной из важнейших диагностических проблем является сопоставление клинической и лабораторной информации о больном аллергией. Долгие десятилетия наиболее востребованными методами специфической аллергологической диагностики были кожные тесты: скарификационные, пробы уколом (prick-test), внутрикожные и аппликационные, реже использовались провокационные пробы с аллергенами (интраназальные, конъюнктивальные, аппликационные). В последние десятилетия 20 века стремительно стали совершенствоваться методы аллергодиагностики *in vitro*, прежде всего определение специфических иммуноглобулинов Е. Однако, сопоставление данных анамнеза, более чем на 70 % определяющего клинический диагноз, с результатами, полученными с помощью лабораторных методов специфической диагностики, выявило достаточно большой процент несовпадений. С расширением перечня (сотни аллергенов) специфических лабораторных исследований аллергенспецифического IgE, возникла некоторая абсолютизация его вклада в диагноз аллергии по принципу: выявлены аллер-

генспецифические IgE – есть аллергия, нет – значит и аллергии нет. Это положение неверно не только потому, что исключается анализ и синтез анамнестической, клинической информации о больном, но и тем, что с иммунологической точки зрения спектр и уровень специфических IgE отражает реализацию только одного (первого) из 4 основных типов аллергических реакций. Следовательно, при отсутствии исследований, позволяющих оценить участие в патогенезе конкретного аллергического заболевания других типов аллергии, невозможно исключение сенсibilизации, обусловленной оставшимися тремя патогенетическими механизмами.

В то же время возможность выявить аллергенспецифические IgE появляется при правильно реализованной стратегии лабораторной диагностики, позволяющей включить в скрининговые исследования необходимые аллергены. Ведь при отсутствии в панели «виновного» в сенсibilизации аллергена он, естественно, не может быть выявлен, т. е. результат скрининга у больного аллергией может быть отрицательным.

4.5. Использование лабораторных методов в диагностике некоторых форм аллергии

Лекарственная аллергия

В настоящее время не существует абсолютно достоверных лабораторных тестов для диагностики лекарственной аллергии (ЛА), поэтому исследователи постоянно совершенствуют уже имеющиеся методики и разрабатывают новые. Лабораторное аллергологическое исследование при лекарственной аллергии проводят, когда необходимо уточнить диагноз на фоне лечения, направленного на купирование острой реакции. Оно включает определение уровня гистамина, триптазы, общего и аллергенспецифического IgE в сыворотке крови. В настоящий момент разработаны тест-системы для выявления IgE антител к следую-

щим лекарствам или их метаболитам: пенициллину G (бензил-) и V (феноксиметил-), пеницилламину, ампициллину, амоксициллину, триметоприму, суксаметонию, тиопенталу натрия, ибупрофену, ацетилсалициловой кислоте, каптоприлу, лидокаину, АКГТ, инсулину и ряду других.

Если данные первичного исследования не позволяют выявить аллерген, то повторное аллергологическое исследование, направленное на уточнение причинно-значимого аллергена, проводят не ранее чем через 6-12 мес. после купирования острой реакции и окончания периода рефрактерности. Ряд тестов, например, высвобождения гистамина из базофилов и лейкоцитов, используют для диагностики как лекарственной, так и латексной аллергии. Для диагностики латексной аллергии, кроме того, применяют такие методы лабораторного исследования, как иммуноблоттинг (который также используют для диагностики инсектной аллергии), тест пролиферации лимфоцитов (для диагностики клеточно-опосредованных реакций при контактных дерматитах).

Так, для лабораторной диагностики лекарственной аллергии (ЛА) используют следующие методы: базофильный тест (для выявления аллергии к пенициллинам, местным анестетикам, анальгетикам, барбитуратам), тест Шелли и его модификации, реакцию бласттрансформации лимфоцитов (для диагностики реакций замедленного типа при аллергии к антибиотикам, барбитуратам, инсулинам и др.), реакцию торможения миграции лейкоцитов (для диагностики реакций замедленного и немедленного типа), флуоресцентный метод аллергической альтерации лейкоцитов, исследование интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции периферической крови у пациентов с непереносимостью НПВС. Информативность этих тестов изучена недостаточно, а для их выполнения необходима специальным образом оснащённая иммунологическая лаборатория.

Инсектная аллергия

Для проведения диагностики *in vitro* в России используются аллергены тел и яда ос, пчёл, муравьёв, комаров, тараканов, моля, мошки, шершня. Диагностика аллергии на яд жалящих насекомых, а также на слюну кровососущих насекомых, аллергены их тел и метаболиты основана на выявлении IgE-зависимого характера аллергии с помощью обнаружения аллергенспецифических IgE к инсектным аллергенам в сыворотке крови пациента.

Аллергенспецифические IgE против яда или слюны можно выявить только после окончания анафилактического периода, продолжительность которого составляет 2-3 дня после укуса или укуса. При системных поражениях IgE обнаруживают в 70-90%, при местных – в 52% случаев. Приблизительно у 10-20% пациентов, у которых в анамнезе не указаны аллергические реакции на яд жалящих насекомых, обнаруживают в крови аллергенспецифические IgE. Примерно у 60% пациентов, не имеющих в анамнезе указаний на аллергические реакции в отношении слюны кровососущих насекомых, выявляют аллергенспецифические IgE к аллергенам этих насекомых. Аллергенспецифические IgG достаточно часто выявляются не только у пациентов с инсектной аллергией, но и у лиц без таковой (пчеловоды, работники инсектариатов, зернохранилищ). Наличие таких антител, однако, не защищает их при укусах или укусах от развития аллергической реакции. Поскольку пациент не всегда может точно описать насекомое, ужаление, укус которого или контакт с которым привели к развитию аллергической реакции, клинко-лабораторную диагностику целесообразно проводить с использованием наборов аллергенов из разных видов насекомых. При анализе результатов исследований необходимо учесть возможность перекрестно-аллергических реакций на аллергены разных видов насекомых.

Другие методы диагностики, такие как аллергенспецифическая реакция высвобождения гистамина, перекрестный радиоиммуно-электрофорез, тесты дегрануляции базофилов и пролиферации лимфоцитов, не рекомендованы для клинического использования, поскольку они менее чувствительны, более трудоёмки и отличаются высокой себестоимостью.

Ангионевротический отек (отек Квинке)

Для диагностики ангионевротического отека (АО) и дифференциальной диагностики его различных видов (наследственный, приобретенный, вызванный ингибиторами АПФ, лекарственной и пищевой аллергией) и типов наследственного АО (I, II, III) используют следующий перечень основных лабораторных показателей: уровень С1-ингибитора, активность С1-ингибитора, уровни С2, С4, С1q – компонентов комплемента, общего и аллергенспецифических IgE (Табл. 4).

Таблица 4. Лабораторные критерии дифференциальной диагностики ангионевротического отека (АО).

Заболевание	Уровень				Актив- ность С1 инги- битора	Уровень общего IgE	Выяв- ление IgE спец.
	С1- инги- битора	С1q- комп.	С2- комп.	С4- комп.			
Наследствен- ный АО тип I	норм.	норм.	низкий	низкий	низкая	норм.	нет
Наследствен- ный АО тип II	норм.	норм.	низкий	низкий	низкая	норм.	нет
Наследствен- ный АО тип III	норм.	норм.	норм.	норм.	норм.	норм.	нет
Приобретен- ный АО	низкий	низкий	низкий	низкий	низкая	норм.	нет
АО от инг. АПФ	норм.	норм.	норм.	норм.	норм.	норм.	нет
Пищевая аллергия	норм.	норм.	норм.	норм.	норм.	норм. или повыш.	да
Идеопатиче- ский АО	норм.	норм.	норм.	норм.	норм.	норм.	да

Преимущества и недостатки in vitro методов аллергодиагностики

Методы in vitro отличаются полной безопасностью для пациента, объективностью, количественным характером и быстротой получения результатов исследований. Однако, пока имеются и объективные трудности широкого внедрения данных методов в медицинскую практику. Они связаны с необходимостью использования высокотехнологичного современного оборудования – спектрофотометров, проточных цитометров, хемилюминетров, а также соответствующих реактивов и тест-систем.

Преимущества in vitro методов специфической аллергодиагностики:

- отсутствие противопоказаний для проведения исследований при любом заболевании, беременности и лактации;
- объективный характер оценки и интерпретации результатов лабораторных тестов (с помощью приборов);
- количественный способ регистрации результатов (в международных единицах измерения концентрации);
- отсутствие риска возникновения первичной сенсibilизации, развития побочных эффектов или обострения аллергического заболевания;
- наличие единых (по методике ВОЗ) стандартов контроля качества, позволяющих сравнивать результаты, полученные на разных тест-системах;
- отсутствие необходимости ограничения или отмены проводимой терапии;
- проведение исследований в течение короткого (часы) времени в 1 этап;
- отсутствие влияния реактивности кожи и тканей на правильность оценки результата;

- возможность выявления при одном обследовании значительного числа аллергенов (до нескольких сотен);
- отсутствие необходимости исключения из диагностируемого перечня аллергенов, вызвавших системные реакции;
- отсутствие специальных требований к условиям обследования – специализированный аллергологический кабинет или стационар, специалист-аллерголог, средства неотложной терапии.

Недостатки in vitro методов специфической аллергодиагностики:

- необходимость участия специалистов клинической лабораторной диагностики, специального оборудования и тест-систем;
- не могут полностью заменить методы диагностики in vivo (нет полной взаимозаменяемости);
- невозможность корректного сравнения результатов исследований in vivo и in vitro при несоответствии экстрактов аллергенов, используемых для диагностики in vitro, экстрактам аллергенов, используемых для диагностики in vivo;
- относительно высокая стоимость.

5. Цели, задачи и принципы лабораторной диагностики аллергических заболеваний

Лабораторная диагностика аллергического заболевания должна выявлять как специфические, так и патогенетические изменения, возникающие в организме больного аллергией.

Основными задачами специфической и патогенетической лабораторной диагностики аллергического заболевания являются:

- специфической: установление сенсибилизации к аллергенам;

- патогенетической:
 - установление наличия и типа (типов) аллергической реакции;
 - установление характера, степени нарушений иммунной системы и выявление других патогенетических изменений, типичных для диагностируемого аллергического заболевания.

Наиболее важным итогом любого вида диагностики является установление этиологии (причины) заболевания.

Этиологическая диагностика аллергического заболевания состоит в выявлении конкретных причин – аллергенов, вызывающих развитие симптомов болезни, а также связей между причиной (аллергеном) и следствием (аллергическим заболеванием).

Для этой цели используются как клинические (анамнез, кожные тесты), так и лабораторные исследования (например, определение аллергенспецифических IgE), результаты которых оценивает лечащий врач.

Принципы лабораторной диагностики аллергических заболеваний

Для того, чтобы правильно оценить результаты лабораторной диагностики необходимо определить границы ее возможностей, т.е. по сути решить два вопроса – что можно выявить лабораторными методами и можно ли с помощью специфических методов лабораторной диагностики установить наличие аллергического заболевания?

Главной, определяющей границей лабораторной диагностики является объект изучения – отдельные среды (кровь, моча, спинномозговая жидкость и т.п.) организма. Таким образом, лабораторная диагностика, изучая изменения отдельных сред, пытается ответить на вопрос об изменениях целостного организма, используя знания о типичных для определенной патологии изменениях изученных сред. Следовательно, ее выводы

более точны в отношении отдельной среды и носят вероятностный характер по отношению целого организма. Таким образом, лабораторный диагноз уже изначально отражает только изменения в изученной среде, характеризуя их либо как патологические, либо отмечая их как те, что присущи нормальным изменениям. Что касается изучаемых параметров (показателей) среды, то можно сказать, что они объективно ограничены возможностями используемых приборов и реактивов, а также целями исследования.

Используя информационный подход, мы можем сказать, что лабораторная диагностика дает информацию о части (отдельных средах) организма. Информация о целом организме складывается в голове лечащего врача на основании синтеза информации о всех изменениях организма, получаемых из данных анамнеза, дополнительных, в том числе инструментальных, методов обследования.

Приоритет клинического этапа (объем и методы лабораторных исследований определяются на этапе клинического обследования).

Прежде чем назначить конкретный лабораторный метод специфической аллергологической диагностики, необходимо учесть особенности иммунологического механизма реализации аллергической реакции у пациента и определить круг предполагаемых аллергенов. Для этой цели врач-аллерголог анализирует анамнез, клинические проявления заболевания в прошлом и настоящем, ориентировочно предполагая спектр аллергенов и тип (типы) реакции иммунной системы. Анализируя имеющиеся клинические симптомы или синдромы, он относит их к определенному типу аллергических реакций, участники которой (например, IgE специфический при аллергических реакциях 1 типа) должны быть выявлены лабораторными методами.

Таким образом, он формирует стратегию лабораторного об-

следования и определяет методы для выявления сенсibilизации. Врач клинической лабораторной диагностики, используя лабораторные методы, при специфической диагностике может определить только наличие сенсibilизации, то есть диагностирует специфические, по отношению к конкретному аллергену, изменения иммунной системы больного (наличие специфических антител, аллергенспецифических рецепторов и сенсibilизированных клеток). Однако эти изменения – сенсibilизация – могут быть не связаны с клиникой того заболевания, по поводу которого больной обратился к врачу. Так, например, выявленная при обследовании сенсibilизация к пыльце растений может не иметь отношения к этиологии болезни, по поводу которой обратился пациент, например, аллергическому контактному дерматиту, причиной которого являлась аллергическая реакция на латекс.

Роль лечащего врача-аллерголога в тандеме аллерголог – врач клинической лабораторной диагностики.

Поскольку основной задачей врача клинической лабораторной диагностики в процессе иммунологического обследования больного аллергией является выявление сенсibilизации (установление круга аллергенов) и характеристика изменений иммунной системы, типичных для аллергии, то для сопоставления и анализа всей информации о больном он передает данные об иммунологическом обследовании врачу-аллергологу. Поскольку на основании только лабораторной информации невозможно полноценная этиологическая диагностика, необходимо сопоставление различных данных о больном. Врач-аллерголог на основании клинических (кожные тесты) и лабораторных данных (специфическая диагностика изменений иммунной системы) устанавливающих наличие сенсibilизации, сопоставляет ее спектр и выраженность с данными анамнеза, клиники, результатами дополнительных методов исследований с целью выявления связи между этими явлениями.

Установление причинно-следственной связи между аллергеном, к которому выявлена сенсибилизация, и его действием, подтвержденным данными анамнеза, клинических, лабораторных и дополнительных методов исследований больного аллергией, является целью этиологической диагностики. Таким образом, аллерген признается этиологическим агентом аллергического заболевания у данного пациента только после установления такой связи.

Ведущая роль в установлении этой связи принадлежит специалисту, обобщающему всю имеющуюся информацию – лечащему врачу.

Патогенетическая адекватность иммунодиагностики (соответствие используемых методов лабораторных исследований патогенезу изучаемых реакций)

Для диагностики каждого типа реакций должен применяться свой метод, выявляющий участников именно этого типа иммунной реакции. Для того, чтобы выявить участников иммунологической фазы реализации аллергии необходимы различные тесты, в соответствии с типом аллергической реакции.

При аллергических реакциях I типа (анафилактических):

- определение аллергенспецифических Ig E (редко IgG4) методами иммуноферментного анализа (ИФА), иммунохемилюминесцентного (ИХЛ) анализа.

При аллергических реакциях II типа (цитотоксических): определение аллергенспецифических IgG и IgM (иммунные цитопении) проводят с помощью:

- реакции преципитации в агаре;
- пробы Кумбса;
- теста связывания комплемента.

При аллергических реакциях III типа (иммунокомплексных):

- определение содержания циркулирующих иммунных комплексов;
- определение содержания IgG и IgM;
- оценка реакции аллергенспецифической активации базофилов (базофильные тесты);
- определение содержания компонентов комплемента и C1 ингибитора методами ИФА, радиальной иммунодиффузии.

При аллергических реакциях IV (замедленного) типа:

- тест трансформации лимфоцитов (при аллергии к антибиотикам пенициллинового ряда, сульфаниламидам, карбамазепину, НПВС);
- тест торможения миграции макрофагов;
- проточная цитометрия для определения специфических субпопуляций Т-лимфоцитов;
- тесты цитотоксичности лимфоцитов (при аллергии на сульфаниамиды);
- тесты для определения микросомальной продукции антител, вызванной лекарствами, с использованием иммуноблоттинга (при аллергии к галотану, противосудорожным препаратам, сульфаниламидам).

Для выявления медиаторов патохимической стадии аллергических реакций рекомендуется проведение следующих исследований:

- тест высвобождения гистамина и лейкотриенов после инкубации с аллергеном;
- определение альфа и бета форм триптазы крови (при анафилаксии).

Сочетание специфических и неспецифических тестов иммунодиагностики

Тесты в аллергодиагностике условно могут быть разделены на 2 большие группы:

- **специфические**, которые в свою очередь могут быть разделены на морфологические (выявление участвующих в иммунологической фазе аллергической реакции антител и клеток) и функциональные (выявление аллергенспецифической активности клеток иммунной системы);
- **неспецифические** (направленные на выявление типичных для аллергии изменений иммунной системы).

Для полноценной характеристики всех – специфических и неспецифических (патогенетических) изменений иммунной системы, лечащему врачу необходимо знание об этиологических и патогенетических особенностях конкретной аллергопатологии. Назначая проведение лабораторного обследования он должен планировать его с учетом диагностических возможностей как специфических, так и неспецифических тестов.

Установление неиммунологических механизмов аллергии путем исключения иммунологических

Известно, что аллергические и псевдоаллергические процессы различаются, главным образом, наличием (при аллергии) или отсутствием (при псевдоаллергии) иммунологической (первой) фазы аллергической реакции. Поскольку 2 другие фазы – патохимическая и патофизиологическая – у данных процессов общие, то можно формулировать еще один важный принцип дифференциальной диагностики аллергии и псевдоаллергии – установление неиммунологических (псевдоаллергических) механизмов заболевания путем исключения иммунологических.

6. Учет специфичности и чувствительности тестов лабораторной диагностики.

Тесты лабораторной диагностики характеризуются определенными диагностическими параметрами, главными из которых являются специфичность и чувствительность. Критерии чувствительности и специфичности были предложены J. Yerushalmy в 1947 году и в настоящее время достаточно широко применяются. Этими же критериями руководствуются, в том числе, при оценке качества тест-систем, используемых для лабораторной диагностики.

Поясним это на примере наиболее часто используемых в аллергодиагностике ИФА тест-систем. Для изучения чувствительности и специфичности иммуноферментных тест-систем используют стандартные панели материала, содержащего то или иное вещество (антитела или антигены). При отборе образцов для стандартных панелей используют референтные (наиболее чувствительные и достоверные) лабораторные методы, при помощи которых определяют присутствие и уровень содержания вещества. Панель может включать только положительные, только отрицательные, не содержащие искомого вещества, образцы либо быть смешанной. В составе панелей положительных образцов могут находиться образцы сывороток, как с высоким, так и с низким (близким к пороговому значению) содержанием анализируемого вещества.

В качестве критерия, используемого для сопоставления истинности результатов, получаемых разными методами, используется понятие «золотого стандарта», т.е. какой-то метод признается эталоном, с которым и сравнивают другие методы. Все результаты исследований, по отношению к результатам «золотого стандарта», могут быть: у больных – истинно положительными (ИП) и ложно отрицательными (ЛО), у здоровых – истинно отрицательные (ИО) и ложно-положительные (ЛП).

Практика показывает, что используемые тест-системы могут распознавать положительные образцы как положительные и как отрицательные. Во втором случае результат является ложноотрицательным. При исследовании отрицательных образцов так же возможно правильное и неправильное определение. Положительный результат отрицательного образца является ложноположительным.

Чувствительность рассчитывается по формуле, учитывающей наличие ложноотрицательных результатов:

$$\text{Чувствительность} = \frac{П}{(П+ЛО)} \times 100\%,$$

Примечание: П – число положительных проб, правильно распознанных тест-системой;

ЛО – число ложноотрицательных результатов, соответствующее числу положительных проб, не распознанных тест-системой.

При определении специфичности используют стандартные панели отрицательных образцов. Для расчета специфичности используют число ложноположительных результатов:

$$\text{Специфичность} = \frac{О}{(О+ЛП)} \times 100\%,$$

Примечание: О – число отрицательных проб, правильно распознанных тест-системой;

ЛП – число ложноположительных результатов, соответствующее числу отрицательных проб, ошибочно распознанных тест-системой как положительные.

Таким образом, важнейшими диагностическими характеристиками ИФА тест-систем – являются чувствительность (частота положительного результата теста у больных) и специфичность (частота отрицательного результата теста, получаемая у здоровых лиц), по отношению к «золотому стандарту». Эти показатели выражаются в процентах и позволяют понять врачу возможности тестов, которые были использованы для лабораторной диагностики. Имея,

например, данные о тест-системе: чувствительность – 98% мы можем сказать, что данная тест-система может иметь 2 ложноотрицательных результата при 100 исследованиях. При специфичности равной 97%, например, мы можем предполагать наличие 3 ложноположительных результата при тех же 100 исследованиях.

Таким образом, диагностические возможности использованных тестов существенным образом сказываются на результатах лабораторной диагностики у больных аллергией и должны приниматься в расчет при их анализе лечащим врачом.

6. Современные варианты и технологии иммуноанализа

Методы, используемые в аллергологической диагностике *in vitro*, базируются на достижениях иммуноанализа. Классические методы иммунохимического анализа были описаны ещё в конце XIX века в работах таких выдающихся учёных как Эрлих, Борде, Ландштейнер. Были открыты закономерности, основанные на образовании антителами в присутствии антигена преципитата (осадка). Однако для визуальной регистрации преципитации необходимы были высокие концентрации компонентов и длительное время проведения реакции. Результаты такого анализа не всегда можно было однозначно интерпретировать и, кроме того, в большинстве случаев они носили качественный или полуколичественный характер. Лучшую индикацию комплекса антиген-антитело удалось осуществить после того как было предложено ввести в один из исходных компонентов реакционной системы метку, которая затем легко могла быть детектируема соответствующим физико-химическим методом. Весьма удобными для этой цели оказались изотопные, ферментные, флуоресцентные, парамагнитные метки, использование которых дало возможность увеличить чувствительность иммунохимических методов в миллионы раз, а время анализа уменьшить до нескольких часов.

Иммунохимические методы, основанные на применении меченых реагентов, нашли широкое распространение для количественного определения биологически активных соединений самой разнообразной структуры – от низкомолекулярных гормонов и антител до высокомолекулярных вирусов и целых клеток.

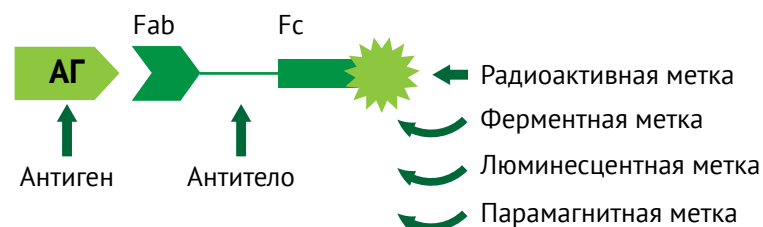


Рис. 11. Способы индикации реакции антиген-антитело.

6.1. Иммуофлуоресцентный анализ

В 50-х годах прошлого столетия, Кунсом и Капланом (Coons A.H., Kaplan M.H.) была изучена возможность соединения флуоресцентных красителей с антителами без утраты последними способности связываться с антигенами.

В результате был разработан метод иммуофлуоресценции, сочетавший чувствительность и специфичность иммунных реакций и топографическую точность микроскопии, что сразу нашло применение в иммуногистохимии. Благодаря специальным системам светофильтров, использованию различных флуорохромов, иммуофлуоресценция позволяла одновременно и в тоже время раздельно регистрировать реакцию с тем или иным антителом, так, что становилось возможным выявление разных антигенов, локализованных в одной и той же области препарата. Методика, обеспечившая связывание флуорохрома с антителами, лишь незначительно снижала активность используемых антител, а специальное оборудование позволяло визуально

регистрировать свет, испускаемый ничтожным количеством флуорохрома – 10-15г. флуоресцеина. В настоящее время разработаны автоматизированные многоцветные проточные цитофлуориметры, позволяющие определять различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток, характеристики клеточного цикла деления, экспрессию ряда рецепторов и другие параметры иммунной системы. Основным препятствием для широкого внедрения данного методического подхода к иммунодиагностике является высокая стоимость проточных цитофлуориметров (от 50 до 120 тысяч долларов) и реактивов для проведения иммуноанализа.

6.2. Хемилюминесцентный анализ

Различают биолюминесценцию и хемилюминесценцию. В первом случае речь идет о каскаде биохимических ферментативных реакций, которые ускоряются нуклеотидами (АТФ, НАДФ), во втором случае – о химическом окислении перекисью водорода люминола и некоторых его производных. Хемилюминесценция (ХЛ) характеризуется чувствительностью на уровне 10⁻²¹-10⁻²³ моль/л. Итоги реакции расцениваются по наличию хемилюминесцентного свечения, интенсивность которого пропорциональна концентрации аллергенспецифических IgE в сыворотке крови. Методика анализа разработана в 80-е годы и является до сих пор широко применяемой в разных странах.

В настоящее время большую популярность приобрел автоматизированный иммунный анализ, основанный на явлении ХЛ. Характеристики автоматических иммуноанализаторов отличаются широтой диапазона тестов; производительностью – более 100 тестов в час; возможностью выполнения экстренных исследований; двусторонней связью с лабораторной информационной системой; штриховым способом кодирования первичных пробирок с образцами; хранением калибровочных кривых; низкой стоимостью работы. Несмотря на ряд преимуществ, ав-

томатизированный хемилюминесцентный анализ имеет и ряд недостатков, главным из которых является высокая себестоимость 1 исследования (Табл. 5).

Таблица 5. Преимущества и недостатки хемилюминесцентного автоматизированного метода анализа:

Преимущества	Недостатки
Высокая аналитическая чувствительность (10-21-10-23 моль) и производительность (более 100 тестов)	Необходимость приборного обеспечения, отсутствие возможности визуальной оценки результата исследований
Широкий диапазон определяемых концентраций с сохранением высокой точности на любом отрезке калибровочной кривой	Относительно высокая стоимость 1 исследования (в 3-6 раз выше чем стоимость 1 исследования методами классического ИФА, иммуноблота; в 2-3 раза выше стоимости реверсивного варианта ИФА)
Обширный спектр диагностируемых аллергенспецифических IgE	Невозможность экспресс (30 минут) анализа
Возможность формирования индивидуального набора аллергенов	Обязательность высокой специальной квалификации персонала

6.3. Иммуноферментный анализ (ИФА)

В ходе поиска метода с высокой чувствительностью и специфичностью в начале 1970-х годов был предложен метод с ферментной меткой (E. Engvall, P. Perlman, 1971; K. Rubenstein et al., 1972), он получил наиболее широкое применение. Объясняется этот факт особыми преимуществами ферментной метки, которая не только позволяет «проявлять» комплексы антиген-антитело, но и обладает следующими отличительными свойствами:

1. Многократно усиливает сигнал. Являясь по своей природе мощными химическими катализаторами, ферменты способны за короткое время эффективно осуществлять наработку

легко детектируемого продукта, что делает возможным определение ферментной метки в весьма малых концентрациях (до 10-12 моль/л и ниже).

2. Позволяет в определенных случаях проводить анализ без разделения вошедших в комплекс и не связавшихся компонентов.
3. Позволяет регулировать каталитическую активность.

Все существующие варианты ИФА имеют следующие стадии:

- иммунной реакции: получение иммунохимического комплекса в результате поэтапного или одномоментного добавления иммунных реагентов, один из которых содержит ферментную метку;
- промывки, целью которой является удаление не связавшихся компонентов;
- ферментативной реакции за счет добавления субстрата (или субстрата и хромогена) с последующим внесением стоп-реагента для остановки реакции;
- учета и интерпретации результатов анализа.

Общим признаком методов иммуноанализа является использование иммунных агентов-антител и антигенов, вступающих в реакцию образования иммунных комплексов, которые выявляют с помощью фермента, которым предварительно метится один из компонентов (антиген или антитело).

Благодаря своей высокой чувствительности, специфичности и методической простоте, иммуноферментный анализ получил широкое распространение в лабораторной диагностике аллергических заболеваний. С его помощью решаются различные задачи, которые, в конце концов, сводятся к обнаружению трех объектов-аллергенов, специфических иммунных комплексов и антител, из которых наиболее часто определяются иммуногло-

булины класса E.

6.3.1. Классические варианты иммуноферментного анализа (ИФА) аллерген-специфических иммуноглобулинов E

При неконкурентном варианте ИФА реакция происходит с участием 2 главных компонентов: связанных с твердой фазой веществ (аллергенов) и специфических иммуноглобулинов E пробы (опытной или контрольной). После инкубации пробы, промывки и удаления несвязанных компонентов вносят меченые ферментом антитела к иммуноглобулину E (конъюгат), вновь проводят инкубацию, промывку и добавляют последовательно субстрат и останавливающий реагент (стоп-раствор). При наличии в пробе аллергенспецифических иммуноглобулинов класса E на твердой фазе будет последовательно создаваться сложный иммунный комплекс, состоящий из аллергена + аллергенспецифического иммуноглобулина E + антител к иммуноглобулину E, меченых ферментом. Степень изменения ферментом окраски раствора измеряют на спектрофотометре, а затем сравнивают ее с данными контрольной пробы, содержащей аллергенспецифический IgE.

Гораздо реже используется конкурентный вариант иммуноферментного анализа аллергенспецифических иммуноглобулинов E. В данном варианте используется реакция между аллергенами, связанными с твердой фазой, а также мечеными ферментом IgE антителами к нему и немечеными IgE антителами опытной пробы, которые конкурируют за связывание с аллергеном. Фермент-меченые антител связываются тем меньше, чем больше специфических антител в пробе.



Рис. 12. Схема неконкурентного анализа для определения аллергенспецифических IgE.

Определение содержания иммуноглобулинов общего класса E часто проводится в варианте конкурентного анализа. Для этой цели используют тест-системы, работающие по схеме «сэндвича». В данном случае иммуноглобулины рассматриваются как антигены. Молекула иммуноглобулина E связывается вначале с анти-IgE-антителами, иммобилизованными на твердой фазе, а затем к данному комплексу присоединяются антитела конъюгированные с ферментом.



Рис. 13. Схема конкурентного анализа для определения аллергенспецифических IgE.

«Capture» вариант иммуноферментного анализа аллерген-специфических иммуноглобулинов E

В последние годы разработана технология определения концентрации аллергенспецифического IgE в сыворотке крови человека методом двухстадийного «capture»-варианта иммуноферментного анализа.

Принципиальное отличие данного вида анализа от классических вариантов состоит в том, что для выявления аллергенспецифических IgE используется двухстадийная последовательность их связывания. На первой стадии исследуемые образцы, содержащие аллергенспецифические IgE в лунках микропланшета, инкубируют с растворами биотинилированных аллергенов, поверхность которых покрыта мышиными моноклональными антителами к IgE человека. Если в пробе имеется IgE, специфичный к конкретному биотинилированному аллергену, то происходит одновременное связывание IgE с аллергеном и с моноклональными антителами к IgE человека.

После удаления несвязавшегося материала в лунки планшета добавляется конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена.

Во время второй инкубации конъюгат стрептавидин-пероксидаза связывается с биотинилированным аллергеном. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Во время инкубации с раствором хромогена (тетраметилбензидин, ТМБ) в субстратном буфере происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связанного аллерген-специфического IgE. Измерение оптической плотности производится на спектрофотометре при длине волны 450 нм и 405 нм.

Для количественного выражения концентрации специфического IgE на тот же микропланшет наносятся калибровочные

пробы с известными концентрациями общего IgE, которые инкубируются с конъюгатом анти-IgE-биотин. Вторая инкубация с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза проводится одинаково для образцов и калибровочных проб.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация специфического IgE, выражающаяся в Международных Единицах (МЕ).

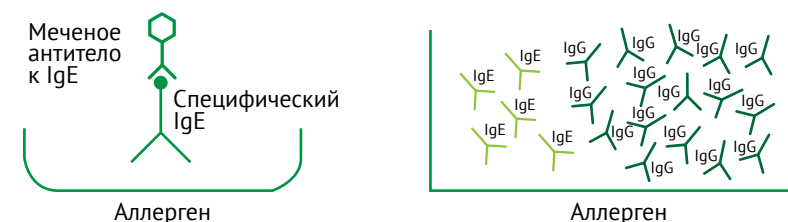


Рис. 14. Классический аллергосорбентный вариант ИФА.

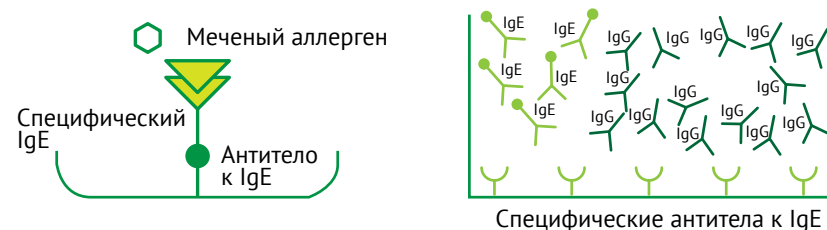


Рис. 15. Двухстадийный «capture»-вариант ИФА.

Данная технология имеет преимущества, по сравнению с классическим ИФА, в связи с тем, что в отличие от методики связывания аллергена на твердой фазе реакция связывания аллергена и специфического IgE происходит в жидкой среде, что увеличивает степень доступности аллергена для связи с IgE.

Кроме того, данная жидкофазная методика легко адаптируется к автоматизированным системам постановки иммунологических анализов, не требует, как в случае с постановкой исследований на твердофазных дисках, специальных вошеров для процедуры промывки, а также позволяет провести измерение оптической плотности пробы на спектрофотометре при длине волны как 450 нм, так и 405 нм, что повышает точность анализа и расширяет диапазон определяемых концентраций специфического IgE (Табл. 6).

Таблица 6. Сравнительная характеристика аллергосорбентных и «capture» технологий ИФА.

Параметры	Классические твердофазные аллергосорбентные тесты	Реверсивный аллергосорбентный тест (REAST, «capture»)	Преимущества «capture»-технологии ИФА
Твердая фаза	Лунка, диск, мембрана	Лунка	Нет необходимости использования «твердой фазы» с высокой сорбционной емкостью
Требования к сорбционной емкости т.ф.	Высокие	Низкие	Повышение качества за счет снижения влияния емкости «твердой фазы». Возможность использования лунок микропланшетов
Аллергены	Фиксированы на «твердой фазе» (лунка микропланшета, диск, мембрана)	Жидкие биотинилированные	Меньшая степень изменения аллергена
Выбор аллергенов	Панели аллергенов сформированные производителем	Свободный выбор – индивидуальный подбор любого сочетания аллергенов	Нет привязки к панелям производителей

Условия реакции аллерген-специфический IgE	Уменьшение площади контакта аллергена за счет сорбции на твердой фазе	Полная доступность аллергена	Увеличение степени доступности аллергена для связи с IgE
Необходимость в специальном оборудовании (в дополнение к стандартному для ИФА)	Для аллергенов на дисках его связи с твердой фазой	Не требуется	Удобство для лаборатории
Детекция	Одноволновая его связи с твердой фазой	Двухволновая	Расширение диапазона определяемых концентраций, повышение точности результата с IgE

Таким образом, современные технологии иммуноферментного анализа специфических иммуноглобулинов Е обладают рядом неоспоримых преимуществ:

- Экономическая доступность, т.к. себестоимость одного ИФА исследования в основном существенно ниже, чем себестоимость такого же исследования другими методами;
- Технологии просты для выполнения и, следовательно, не требуют высокой квалификации персонала или наличия специального оснащения;
- Универсальность обычного оборудования для ИФА-исследований, т.е. возможность использования этого оборудования для любых ИФА-исследований, в том числе IgE;
- Лучшее, на сегодняшний день, соотношение цена/качество исследования (по основным характеристикам – стоимость 1 исследования, чувствительность, специфичность);
- Возможность полноценной автоматизации ИФА-исследований, обработки и хранения полученной информации;
- Высокий уровень стандартизации и контроля качества всех видов ИФА-исследований, достигнутый за последние 20 лет.

6.3.2. Варианты ИФА, основанные на технологии выявления аллергенспецифических иммуноглобулинов Е на нитроцеллюлозных мембранах (иммуноблотинг)

В настоящее время развитие иммуноанализа привело к появлению новых технологий. Одной из них является технология выявления специфических IgE на нитроцеллюлозных мембранах, не совсем точно называемая иммуноблот. Дело в том, что антигены на тест-полосках таких систем просто наносят в фиксированные области. При создании же истинного иммуноблота формирование антигенсодержащих областей нитроцеллюлозной мембраны происходило посредством электрофоретической разгонки антигенного лизата (или комплекса) в результате чего происходило разделение антигенов по молекулярным массам. Основной частью системы иммуноблота является тестовая нитроцеллюлозная мембрана. Специфические аллергены при изготовлении тест-системы наносятся на определенные участки поверхности нитроцеллюлозной мембраны. После того как проба сыворотки крови пациента наносится на тестовую нитроцеллюлозную мембрану кассеты и инкубируется при комнатной температуре, аллерген-специфические IgE-антитела, содержащиеся в пробе сыворотки крови, вступают в реакцию с аллергенами, нанесенными на тестовую нитроцеллюлозную мембрану кассеты и связываются с ними. Несвязанные аллерген-специфические IgE-антитела удаляются путем промывки. После этого на тестовую нитроцеллюлозную мембрану наносятся антитела к человеческим иммуноглобулинам Е, меченные биотином, и инкубируются при комнатной температуре. Они вступают в реакцию с соответствующими специфическими иммуноглобулинами Е, связавшимися после первой инкубации пробы сыворотки крови с соответствующими аллергенами на тестовой нитроцеллюлозной мембране.

Не связавшиеся антитела к человеческим иммуноглобулинам

Е удаляются путем промывки. На следующем этапе на тестовую нитроцеллюлозную мембрану кассеты наносят стрептавидин, конъюгированный со щелочной фосфатазой, который после инкубации при комнатной температуре связывается с биотином из состава комплекса аллерген/аллерген-специфические иммуноглобулины Е/связанные с биотином поликлональные антитела к человеческим иммуноглобулинам Е. Не связавшийся стрептавидин-конъюгат удаляется путем тщательной промывки. В последующем при нанесении субстрата на тестовую нитроцеллюлозную мембрану кассеты происходит специфическая ферментативная реакция окрашивания щелочной фосфатазы, что ведет к формированию преципитата на мембране кассеты (проявление полосок, каждая из которых находится на месте фиксации определенного аллергена). Интенсивность окрашивания полосок прямо пропорциональна содержанию (концентрации) специфических иммуноглобулинов Е в пробе сыворотки крови.

Существуют три принципиально отличающихся подхода к оценке результатов исследования: качественный, полуколичественный и количественный. При качественном варианте оценка происходит визуально (т.е. субъективно), за счет сравнения интенсивности окрашивания полос тестового и контрольного образцов. Результат при данном подходе фиксируется по принципу «да-нет» (в нашем случае выявлены или не выявлены специфические антитела класса IgE). При полуколичественном способе оценка результата может проводиться в условных единицах, например в классах или крестах.

Для полуколичественного способа оценки результатов определения специфического IgE используют вариант оценки в классах, соответствующих границам концентрации IgE (Табл. 7). При этом интенсивность окрашивания полос пробы сравнивают с интенсивностью окраски полосок образцов, полученных при соответствующих концентрациях специфического IgE, под-

бирая по сходству степени интенсивности (проба должна быть подобна образцу).

При количественном варианте оценка проводится за счет точного измерения интенсивности окрашивания полос тестового образца и сопоставления ее с графиком, полученным при различных концентрациях специфического IgE. Результат фиксируется в единицах концентрации специфического IgE (kU/L или МЕ/мл), либо, возможно, также в классах, имеющих соответствие определенным границам концентраций.

Таблица 7. Полуколичественный способ оценки концентрации специфических иммуноглобулинов E.

Класс	Концентрация специфического IgE kU/L	Интерпретация результата
0	< 0.35	Отрицательный
1	0.35 – 0.69	Неоднозначный, часто без клинических проявлений
2	0.70 – 3.49	Слабо позитивный
3	3.50 – 17.49	Позитивный, с выраженными клиническими проявлениями
4	17.50 – 52.49	
5	52.50 – 99.99	
6	> 100	

Фиксация результатов теста возможно либо с помощью сканера, либо с помощью специального устройства – цифровой камеры, оснащенной специальной программой для компьютера. С помощью данного подхода получают цифровую фотографию тестовой нитроцеллюлозной мембраны кассеты и анализируют интенсивность окрашивания каждой полоски, проявившейся на тестовой нитроцеллюлозной мембране.

Чувствительность метода иммунного блота для определения специфических IgE по данным мировой научной литературы, в сравнении с иммуноферментным методом (ELISA), является более низкой и составляет примерно 85%, а специфичность 95%.

Основным их предназначением является предварительное установление наличия сенсибилизации на основе которого может быть намечено более развернутое уточняющее клиническое и лабораторное обследование больных аллергией.

7. Технологии создания аллергенов для диагностики и их совершенствование

Еще сравнительно недавно, вплоть до 90-х годов XX века, аллергологи России могли использовать для специфической диагностики и лечения аллергены, приготовленные в форме водно-солевых экстрактов. Лечебное применение водно-солевых препаратов аллергенов, содержавших высокие дозы аллергенов, с недостаточной стандартизацией, зачастую сопровождалось повышением риска развития системных реакций при их применении.

Недостатки водно-солевых экстрактов аллергенов:

- неоднородны, содержат одновременно аллергенные и неаллергенные молекулы, стандартизация затруднительна;
- содержание аллергенных молекул зависит от характеристик источника, способа экстракции, очистки и хранения;
- экстракция снижает полноценность аллергенов, изменяя их свойства.

Поэтому постепенно совершенствовались технологии очистки аллергенов, получаемых из натуральных продуктов, а также методики контроля их качества. Постепенно вырабатывались требования к лечебным препаратам, которые были обобщены в решении комиссии по аллергенам и иммунодиагностическим препаратам Комитета медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) при Министерстве здравоохранения СССР, которые включали следующие характеристики:

- требования к условиям хранения и качеству сырья;
- требования к реактивам, дистиллированной воде и стеклянным емкостям;
- физико-химические свойства аллергена (рН, концентрация фенола, изотоничность, уровень единиц белкового азота – PNU, содержание полисахаридов, алюминия и др.;
- иммунологическая безвредность (сенсibiliзирующая активность) диагностической дозы препарата;
- токсичность аллергена;
- иммуномодулирующее действие;
- стабильность активности и состава;
- специфическая активность аллергена;
- пирогенность;

Такая стандартизация требований к созданию аллергенов была безусловно прогрессивной для своего времени.

Следующим этапом создания новых свойств уже известных аллергенов была попытка использовать их модифицированные формы. Целью создания таких форм было изменение их иммунных свойств: одни из них должны были отличаться низкой аллергенной активностью при сохранении хороших иммунизирующих свойств, обеспечивающих продукцию блокирующих антител. Эти препараты получили наименование алергоидов. Другие должны были обеспечить более высокое торможение синтеза специфических IgE, их обозначили как толерогены. Первые попытки изготовления алергоидов относятся к 30-40-м, а толерогенов к 60-70-м годам XX века. Серьезный вклад в разработку направления по созданию модифицированных аллергенов внес D.March, запатентовав в 1978 г. способ, основой которого является воздействие альдегидов, чаще всего формальдегида и глутаральдегида, на исходный экстракт аллергена, предварительно очищенного от низкомолекулярных компо-

нентов. Для СИТ предназначались и другие модифицированные формы аллергенов, для создания которых использовались альгинат натрия (K.Pegelow, 1984), полиэтиленгликоль (W.Lee, A.Sehon, 1977; П.Павель, 1987), кверцитин (A.Malley, 1981), полисаркозин (A.Garman, A.Wheeler, 1983), олигомеры (D.Moran, P.Roy, 1982).

В настоящее время развиваются технологии искусственного получения аллергенов. Это так называемая технология рекомбинантных белков. Ее суть заключается в том, что биологический организм используется для наработки интересующего нас вещества. Например, можно использовать бактерии, внедрив в ее геном участок, который отвечает за экспрессию, синтез необходимого нам аллергена. В этом случае можно говорить о технологии молекулярного клонирования, когда из генома аллергенного продукта вырезается определенный участок и затем вставляется в геном бактерии. После чего бактерия получает возможность этот белок производить.

С развитием техники молекулярного клонирования и рекомбинантных технологий была начата работа по замещению аллергенов, полученных из натуральных экстрактов на их рекомбинантные аналоги. Этапы работы происходят последовательно в виде клонирования (синтез, создание экспрессионного вектора, проверка ориентации конструкции методом ПЦР), экспрессии (трансформация, отбор клонов, контроль лизата), очистки (методом жидкостной хроматографии), гель-электрофореза (анализ состава и степени очистки, объединение чистых фракций).

Таблица 8. Характеристики аллергенов, используемых для лабораторной диагностики.

Характеристики	Натуральные экстракты аллергенов	Очищенные экстракты аллергенов	Рекомбинантные аллергены
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> • Простота технологий получения • Комплекс всех аллергенных компонентов • Сохранение нативной структуры всех аллергенных компонентов • Низкая стоимость 	<ul style="list-style-type: none"> • Чистота аллергена, что является преимуществом для проведения СИТ • Комплекс всех аллергенных компонентов • Сохранение нативной структуры всех аллергенных компонентов • Более низкая, чем у рекомбинантных аллергенов стоимость 	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие балластных веществ • Рекомбинантная модификация аллергена • Монокомпонентный аллерген
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> • Трудность стандартизации из-за естественной вариабельности состава аллергенных компонентов • Невозможность изменения соотношения аллергенных компонентов в экстракте • Наличие балластных веществ (источников неспецифических реакций) 	<ul style="list-style-type: none"> • Более высокая, чем у натуральных экстрактов аллергенов стоимость • Влияние способа очистки на свойства аллергенных компонентов • Изменения соотношения аллергенных компонентов в экстракте 	<ul style="list-style-type: none"> • Более высокая, чем у натуральных и очищенных экстрактов аллергенов стоимость • Риск перекрестных реакций, обусловленных неполной очисткой рекомбинантного аллергена от экспрессионной системы

Создание все новых рекомбинантных аллергенов открывает большие перспективы лабораторной диагностики. С их помощью возможно определение сенсибилизации пациента к полному перечню компонентов, рисующих индивидуальный аллергенный профиль сенсибилизации пациента, включающий как аллергенные компоненты, вызывающие заболевание, так и перекрёстно-реагирующие. Рекомбинантные аллергены могут быть объединены для формирования композиции, содержащей оптимальное соотношение основных аллергенных компонентов из натурального экстракта, и исключающих компоненты, имеющие малое диагностическое значение. Тестирование с отдельными компонентами может быть использовано для более тонкого выявления спектра и степени сенсибилизации, а также для определения перекрёстной реактивности к различным аллергенам. Использование рекомбинантных представляет собой новый инструмент в области диагностики аллергии I типа.

Рекомбинантные аллергены:

- воспроизводят основные действующие детерминанты «естественного аллергены»;
- дают возможность обеспечить более точную дозировку;
- измененная (по сравнению с нативным аллергеном) структура, обеспечивает снижение аллергенности и повышения иммуногенности – спсобности стимулировать выработку блокирующих IgG4 антител.

Выявление спектра сенсибилизации к отдельным компонентам с помощью рекомбинантных аллергенов дает возможность более точного решения при назначении специфической иммунотерапии (СИТ).

Таблица 9. Прогноз эффективности СИТ на основе использования
тестов с рекомбинантными аллергенами пыльцы березы:

Эффективность	Bet v 1 «+»	Bet v 1 «+»	Bet v 1 «+»	Bet v 1 «-»
	Bet v 2, 4 «-»	Bet v 2, 4 «-»	Bet v 2, 4 «+»	Bet v 2, 4 «+»/«-»
	высокая	высокая	средняя	низкая

Если аллергические реакции у пациента обусловлены сенсibilизацией к основному компоненту аллергена пыльцы березы, то с высокой степенью вероятности можно прогнозировать хороший терапевтический эффект от СИТ с экстрактом пыльцы березы, который будет содержать высокую концентрацию этого компонента. С другой стороны, если пациент чувствителен к другому, не к главному компоненту аллергена, иммунотерапия с экстрактом, возможно, будет менее эффективной. Тесты с рекомбинантными аллергенами открывают новые возможности прогнозирования, будет ли назначение СИТ эффективным или нет, и позволяют адекватно применять различные методы.

8. Особенности интерпретации результатов лабораторных исследований общего и аллергенспецифических иммуноглобулинов Е

Поскольку определение специфических и общего иммуноглобулина Е нашло широкое применение в клинической практике аллергологов и врачей других специальностей, рассмотрим особенности интерпретации результатов этих исследований.

Особенности интерпретации исследований общего IgE

- Повышение или снижение уровня общего IgE не исключает

и не подтверждает наличие сенсibilизации к конкретному аллергену.

- Повышение уровня общего IgE может быть не связано с атопией, а возникать при целом ряде других заболеваний, в том числе глистных инвазиях, иммунодефицитах, бронхопульмональном аспергиллезе и др. Верхняя граница нормы общего IgE (100 кЕ/л) у представителей зон, эндемичных по гельминтозам, может быть выше обычной.
- Повышение уровня общего IgE может возникать после перенесенных острых инфекционных заболеваний.
- Нормальный уровень в сыворотке крови больного общего IgE (30-100 кЕ/л) не отрицает наличия сенсibilизации. Примерно у трети больных атопической аллергией уровень общего IgE находится в пределах нормы.
- При сенсibilизации к одному (нескольким) аллергенам содержание общего IgE может быть в пределах нормы, а ряда специфических IgE – повышено.
- Концентрация общего IgE в сыворотке крови может быть в пределах нормы при ряде аллергических заболеваний – неиммунной (псевдоаллергической) хронической рецидивирующей крапивнице и ангионевротическом отеке.
- Повышенный уровень общего IgE является показанием для проведения углубленного аллергологического обследования.

Особенности интерпретации исследований специфических IgE

- Отрицательный результат исследований на специфический IgE может быть обусловлен стратегией скрининга (отсутствовал тест на этот аллерген).
- Отсутствие специфического IgE в сыворотке периферической крови не исключает возможности участия в патогенезе IgE-зависимого механизма аллергической реакции, так как воз-

можен местный синтез IgE или связывания синтезированного IgE тканями, что может происходить без изменения концентрации специфического IgE в периферической крови.

- Специфичные к аллергену иммуноглобулины других классов, особенно IgG (IgG4), в определенных случаях могут быть причиной ложноотрицательных результатов исследований на специфические IgE. Это возможно в случае классического варианта постановки иммуноферментного анализа.
- Высокий уровень аллергенспецифического иммуноглобулина Е характеризует наличие высокого уровня сенсибилизации только по отношению к конкретному изучаемому аллергену.
- При высоких концентрациях общего IgE чаще могут возникать ложноположительные результаты исследований на специфические IgE, т.к. в таких условиях повышается вероятность связывания неспецифических IgE с аллергеном при использовании классических вариантов ИФА.
- Идентичные количественные результаты определения специфического IgE для разных аллергенов не означают их одинакового клинического значения.
- Обнаружение аллергенспецифического IgE (к какому-либо аллергену или антигену) выявляет только сенсибилизацию и еще не доказывает, что именно этот аллерген является причиной (этиологическим агентом) аллергического заболевания

Важно отметить, что окончательное заключение и интерпретация лабораторных данных, т. е. установление этиологической роли аллергена к которому выявлена (подтверждена) сенсибилизация, должны быть сделаны лечащим врачом на основании сопоставления результатов лабораторных исследований с клинической картиной, данными аллергологического анамнеза и дополнительных методов исследований.

Основные причины несовпадения результатов специфической клинической (in vivo) и лабораторной (in vitro) диагностики аллергических заболеваний

Одним из основных тестов in vivo, позволяющих клинически установить сенсибилизацию, является прик-тест: быстрый, доступный, высоко-безопасный, минимально-инвазивный, высокоспецифичный и чувствительный. Он рекомендуется для проведения специфической диагностики документами Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (EAACI), Объединенным советом по аллергологии, астме и иммунологии США (US JCAAI) как главный диагностический метод, выявляющий Ig Е обусловленные реакции у больных аллергическими заболеваниями.

Это единственный кожный тест, который может применяться широко у детей любого возраста, в т.ч. раннего, быстро и легко выполняется не нанося ребенку серьезного повреждения, информативен для врача и родителей, имея низкий процент ложноположительных результатов. Однако они все-таки возможны и возраст здесь играет определенную роль – у детей до 2 лет уровень ложноположительных реакций несколько выше, чем у лиц старшего возраста.

Другой причиной роста числа ложнопозитивных результатов, возникающих при тестировании in vivo являются половые гормоны у женщин. Так, отмечен более высокий уровень ложнопозитивных результатов кожного тестирования при увеличении уровней эстрадиола и лютеинизирующего гормона у женщин в 14-15 день менструального цикла (Табл. 10).

Кроме биологических причин – возрастных особенностей, уровня половых гормонов у женщин, на результаты кожного тестирования безусловно влияет правильность выполнения методики и состояние аллергенов, использованных при тестирова-

нии. Ряд перекрестных реакций между аллергенами, о которых мы уже упоминали ранее, может привести к повышению уровня ложнопозитивных результатов кожного тестирования при клинической диагностике сенсибилизации к пищевым аллергенам (реакции на пшеницу, рыбу, сою). Те же явления отмечаются при специфической клинической диагностике реакций на нативные аллергены, богатые гистамином (Табл. 10).

Причиной ложноположительных результатов тестов *in vitro* могут быть перекрестные реакции между аллергенами различных групп (особенно часто ингаляционными и пищевыми), повышенный уровень общего иммуноглобулина Е, создающий возможность низкоаффинного связывания части общих IgE, имеющих гомологичные эпитопы, сходные с таковыми у специфических к определенному аллергену IgE. Также как при каждом тестировании на результаты тестов *in vitro* безусловно влияет правильность выполнения методики, состояние реактивов и аллергенов, использованных при тестировании.

Одним из важнейших свойств, любого диагностического метода, определяющих число ложнопозитивных реакций получаемых при исследовании с его помощью, является специфичность. Она определяется производителем теста на основании контрольных исследований с диагностическими панелями и указывается в его документальных характеристиках. Поэтому вероятность ложнопозитивных реакций должна быть учтена изначально, на основе характеристик свойств конкретной тест-системы, ее диагностических возможностях изложенных в инструкции к тест-системе (Табл. 10).

Таблица 10. Причины ложноположительных результатов клинической (прик-тесты) и лабораторной (специфический IgE) диагностики аллергических заболеваний.

№ п/п	Кожные прик-тесты с аллергенами	Лабораторные тесты (специфический IgE)
1.	Возраст до 2 лет	Перекрестные реакции между аллергенами различных групп (особенно ингаляционными и пищевыми)
2.	Увеличение уровней эстрадиола и лютеинизирующего гормона у женщин в 14-15 день менструального цикла	Повышенный уровень общего иммуноглобулина Е (низкоаффинное связывание)
3.	Нарушение методики проведения тестирования (повышение дозы аллергена, нарушение техники введения, расстояния между аллергенами менее 2,5 см)	Нарушение методики проведения тестирования (неспецифическое окрашивание)
4.	Нарушение свойств аллергенов при хранении (рН, осмолярность, ирританты с низкой молекулярной массой)	Нарушение свойств тест-систем и аллергенов при хранении
5.	Выраженный уртикарный дермографизм (гиперреактивность кожи)	Предел специфичности используемой тест-системы (при 99% специфичности 1% положительных результатов ложнопозитивен)
6.	Перекрестные реакции кожи у пациентов с аллергией к яду пчел на пыльцевые аллергены	
7.	Определенные пищевые аллергены (20-30% ложнопозитивных тестов при выявлении реакций на пшеницу, рыбу, сою)	
8.	Использование свежих пищевых продуктов, богатых гистамином или лектином, для прик-тестирования	

Что касается причин ложноотрицательных результатов специфической клинической диагностики с помощью прик-тестирования, то можно отметить и здесь связь с возрастными особенностями кожных реакций – снижение реагирования кожи у лиц, старше 65 лет может увеличить число ложноотрицательных результатов. Большую роль играет и изменение иммунореактивности кожи, возникающее при развитии острых и активации хронических заболеваний. Если клиническое исследование с помощью кожных прик-тестов будет проведено в такие периоды, его результаты зачастую могут быть ложноотрицательными (Табл. 11). Изменить специфическое реагирование кожи на аллергены можно заблокировав биохимические, прежде всего медиаторные, механизмы реакции. Так, использование больным для лечения Н1 и Н2-антигистаминных препаратов, может существенно изменить реакции кожи, резко повысив число ложноотрицательных результатов. Эта же закономерность наблюдается у больных получающих трициклические антидепрессанты, блокаторы мембран тучных клеток, глюкокортикостероиды. (Табл. 11).

Кроме перечисленных причин на частоту возникновения ложноотрицательных результатов кожного тестирования безусловно будет влиять, как и в других случаях, правильность выполнения методики и состояние аллергенов, использованных при тестировании. Поскольку клиническими тестами определяется реакция кожи, то ее состояние, как реагирующего органа, может существенно повлиять на результат тестирования. С целью снижения этого влияния используется контроль – реакция кожи на гистамин. Но такая реакция может иметь различные уровни и низком реагировании на гистамин, вероятность получения ложноотрицательных результатов кожного тестирования возрастает. Клинические реакции у больного могут быть обусловлены высоким местным синтезом специфических иммуноглобулинов Е, при этом его содержание в периферической крови может измениться незначительно. Кроме этого специфические IgE могут

быть частично блокированы анти IgE-антителами класса IgG, образуя иммунные комплексы, недоступные для анализа рутинными методами ИФА. Низкий уровень свободных специфически реагирующих иммуноглобулинов Е, может быть и в связи с иммунным ответом на минорные аллергены (Табл. 11).

Таблица 11. Причины ложноотрицательных результатов клинической (прик-тесты) и лабораторной (специфический IgE) диагностики аллергических заболеваний

№ п/п	Кожные прик-тесты с аллергенами	Лабораторные тесты
1.	Возраст старше 65 лет	Высокий уровень в сыворотке крови больного аллерген-специфических IgG (при классическом аллергорбентном варианте ИФА)
2.	Постановка теста в период неполной ремиссии или обострения заболеваний (до 4-х недель)	Высокий уровень специфических антител класса IgG, связывающих антитела класса IgE с образованием иммунных комплексов
3.	Препараты, подавляющие реакции (Н1 и Н2 антигистаминные средства, трициклические антидепрессанты, блокаторы мембран тучных клеток, глюкокортикостероиды)	Низкий уровень аллергенспецифических иммуноглобулинов Е в периферической крови, обусловленный их связыванием в тканях и органах-мишенях
4.	Нарушение методики проведения тестирования	Нарушение методики проведения тестирования
5.	Нарушение свойств аллергенов при хранении или изготовлении	Нарушение свойств аллергенов при хранении или изготовлении
6.	Сниженная индивидуальная реактивность кожи	Разные аллергены, использованные для клинического и лабораторного исследований

7.	Ограничение сенсибилизации органом-мишенью (нос, конъюнктива глаза)	Предел чувствительности используемой тест-системы (при 99% чувствительности 1% отрицательных результатов ложноотрицателен)
8.	Сенсибилизация к минорным аллергенам	Сенсибилизация к минорным аллергенам

При *in vitro* тестировании на частоту возникновения ложноотрицательных результатов может влиять высокий уровень в сыворотке крови больного аллерген-специфических IgG. Это наблюдается при классическом аллергорбентном варианте ИФА, когда аллерген связывается с иммуноглобулинами, которые могут быть представлены как IgG, так и IgE, т.е. конкурировать за аллерген, расположенный в лунке планшета. Блокирование аллергенов с помощью специфических антител IgG класса создает *in vitro* невозможность связи аллергена со специфическими антителами класса IgE (Табл. 11). В сыворотке крови больного могут протекать иммунные реакции связи специфических анти-IgE -антител класса IgG с соответствующими антителами класса IgE с образованием иммунных комплексов. Специфические IgE из этих комплексов становятся недоступны, что может сопровождаться ростом ложноотрицательных результатов ИФА-диагностики. Одной из причин, обуславливающих повышение числа ложноотрицательных результатов может быть низкий уровень аллергенспецифических иммуноглобулинов Е в периферической крови, обусловленный их связыванием в тканях и органах-мишенях. Также как при кожном тестировании на результаты тестов *in vitro* безусловно влияет правильность выполнения методики, состояние реактивов и аллергенов, использованных при тестировании. Одним из важных методических аспектов является правильное сопоставление результатов кожного и лабораторного тестирования. Их можно сравнивать, если они получены в отношении идентичных, либо очень сходных аллергенов. Характеристики аллергенов, полученных различ-

ными способами, из различного исходного сырья, с различной степенью очистки и т.д., могут существенным образом влиять на результаты тестирования. Так же как и при кожном тестировании, сенсибилизация к минорным аллерегам и низкий уровень свободных специфически реагирующих иммуноглобулинов Е, может обуславливать повышение частоты возникновения ложноотрицательных результатов (Табл. 11).

Несмотря на определенные достижения в стандартизации аллергенов и на национальном и на международном уровнях остается проблема унификации созданных стандартов на основе единых эталонов. В этом плане наиболее перспективным направлением считается разработка эталонных рекомбинантных аллергенов. В связи с этим следует отметить итоги реализации Европейского проекта «CREATE» (2008г.), направленного на международную стандартизацию аллергодиагностики и вакцинации. Важно подчеркнуть, особенно это касается главных аллергенов, являющихся наиболее частым источником сенсибилизации. Благодаря реализации данного проекта удалось предложить три аллергена в качестве международных референс-стандартов: rBet v 1, rPhl p 5a, rDer p 2. В данном направлении ведутся активные исследования.

Перспективным направлением будет создание различных комбинаций аллергенных компонентов. Среди них наиболее значимыми могут быть:

- смесь нескольких главных рекомбинантных аллергенов;
- слияние главных аллергенов;
- пептиды или полимеры главных аллергенов;
- химерические аллергены;
- фрагменты или свернутые (folding) варианты рекомбинантных аллергенов.

В заключение еще раз необходимо напомнить главные преимущества лабораторных методов аллергодиагностики: безопасность для пациента, отсутствие противопоказаний, возможность проведения исследований у пациентов любого в том числе раннего детского возраста, в период обострения заболевания, при высокой степени сенсибилизации; выявление реакции на большее число аллергенов за 1 исследование, отсутствие влияния измененной реактивности кожи, а также то, что исследование возможно на фоне лечения.

9. Современные технологии проточной цитометрии и возможности их использования в диагностике аллергических заболеваний

Проточная цитометрия сегодня является одним из наиболее перспективных направлений иммунодиагностики *in vitro*. В последнее время ее методические возможности расширились и включают не только определение мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток, а также анализ клеточного цикла деления, но и подходы, позволяющие выявить функциональные характеристики высокоспециализированных клеток, в том числе способность активации в ответ на действие различных антигенов или аллергенов. Этот прогресс достигнут благодаря развитию лазерной техники и возрастанию спектра параметрического (многоцветного) анализа, а так же в связи с появлением новых видов моноклональных антител, позволяющих идентифицировать поверхностные маркеры внутриклеточных активационных процессов. Способствовало этому создание новых технологий, в частности использовании специально конструированных комплексов специфических пептидов, окрашенных флюоресцирующими красителями и микросфер, конъюгированных с антителами. Остановимся на особенностях современ-

ных тенденций развития проточной цитометрии, технологиях и возможностях их использования в диагностике аллергических заболеваний.

9.1. Возможности проточной цитометрии в определении Th1 и Th2 лимфоцитов

До последнего времени наличие Th1 или Th2 клеток определяли исключительно по продукции внутриклеточных цитокинов, поскольку не было известно мембранных маркеров, характерных для каждого из этих типов Т-клеток. Однако в последнее время, в результате поиска молекул, отличающих Th1 от Th2, были получены моноклональные антитела, которые взаимодействовали с Т-лимфоцитами, причем исключительно с Th2. Молекула, с которой специфически взаимодействуют данные антитела, относится к семейству рецепторов хемоаттрактантов и получила название CRTh2 (Chemoattractant receptor Th2). Фенотип CD4+ клеток, экспрессирующих данный маркер, представляет собой следующее сочетание рецепторов CD45RA-CD45RO+CD25+. Они продуцируют IL-4 (а также IL-5 и IL-13), но не IFN- γ . Таким образом, это антиген-активированные эффекторные Th2-клетки. Впоследствии антиген CRTH2 был обнаружен и на других типах клеток периферической крови, таких как базофилы, эозинофилы, активированные моноциты и CD8+ Т-клетки. Моноклональные антитела против CRTH2 были изучены и кластеризованы, а на 8-рабочем совещании в Аделаиде (HLDA) отнесены к CD294. Используя многоцветный проточноцитометрический анализ и CD294, достаточно легко локализовать Th2 клетки, не прибегая к определению продукции внутриклеточных цитокинов, что и было использовано при атопическом дерматите и аллергических заболеваниях. Данный подход позволяет в клинической практике более точно определять преимущественную направленность изменений иммунной системы. Реализуется возможность диагностики не только

типичных состояний, связанных с Th2 ответом (аллергия), но и что очень важно комбинированных форм иммунопатологии у одного пациента, а значит более адекватного назначения этиотропной и этиопатогенетической терапии.

9.2. Маркеры аллерген-опосредованной активации базофилов

Длительное время исследования базофилов были редкостью для проточной цитометрии, что было связано с методическими трудностями, обусловленными незначительным (до 0,5%) содержанием этих клеток в периферической крови. Определение их свойств, таким образом, не было рутинной задачей. В настоящее время этой проблематике уделяется большое внимание, о чем свидетельствует множество публикаций.

Существует целый ряд специфических антигенов (рецепторов), которые можно выявить на базофилах. Это, прежде всего, мембранный IgE. Однако анализ мембранного IgE представляет довольно сложную задачу ввиду значительных различий экспрессии мембранного IgE у отдельных индивидуумов. В процессе активации базофилов принимают участие маркеры CD63 и CD203с. Они отличаются своей экспрессией и местоположением. CD63 находится внутри клеток, на мембране гранул, которые содержат гистамин, лейкотриены и цитокины. После стимуляции аллергеном происходит дегрануляция клеток и CD63, отделившись от гранул, оказывается на поверхности базофилов. Напротив, CD203с является антигеном самой поверхностной мембраны клетки.

В последнее время маркеры базофилов CD63, CD203с и CD294 (CRTh2) заняли важное положение среди используемых параметров для диагностики *in vitro* аллергенспецифических изменений иммунной системы. Существует не только иммуноферментный (технология CAST - Cellular Antigen Stimulation

Test, тест антигенной стимуляции клеток), но и цитометрический вариант теста стимуляции базофилов – FLOW-CAST (FAST). Этапы выделения лимфоцитов и стимуляции аллергенами для обоих вариантов идентичны. На третьем этапе определяется количество активированных аллергеном базофилов, экспрессирующих на поверхности антиген CD63 (gp53).

Однако, сравнительные исследования уровней специфических изменений показали, что экспрессия CD63 молекул в процессе активации базофилов аллергеном может возрастать примерно на 100%, тогда как экспрессия CD203с рецепторов – до 350%. Таким образом, определение уровня экспрессии CD203с рецептора является более чувствительным тестом для выявления активации базофилов. Как было описано выше, CD294 может экспрессироваться не только на Th2 клетках, но и на базофилах.

Фенотип базофилов можно описать как CD3-CD294+, тогда как активированные аллергеном базофилы будут иметь фенотип CD3-CD294+,CD203с+. Для активации базофилов *in vitro*, как правило, используют агенты, воздействующие на максимальное количество базофилов, такие как анти-IgE, антиFcεRI или синтетический пептид FMLP (Formyl Methionyl Leucyl Phenylalanine). В целях выявления специфической активации могут быть использованы различные аллергены – пищевые, бытовые, пыльцевые, эпидермальные, лекарственные. Внедрение методологии выявления специфической активации предоставило возможность определять наличие сенсибилизации организма к различным аллергенам (например, таким как лекарственные препараты), выявлять механизмы патогенеза аллергии не связанные со специфическим IgE-ответом, диагностировать и дифференцировать псевдоаллергические реакции. Таким образом, проточная цитометрия в настоящее время является одним из перспективных направлений совершенствования аллергодиагностики *in vitro*.

Основные направления развития лабораторной диагностики аллергических заболеваний:

- внедрение современных стандартов лабораторной диагностики аллергических заболеваний;
- внедрение новых методов лабораторной диагностики сенсибилизации;
- расширение возможностей экспресс-диагностики;
- совершенствование методов лабораторной диагностики лекарственной, профессиональной, грибковой сенсибилизации;
- использование единых стандартизованных рекомбинантных или синтетических аллергенов как для тестов *in vitro*, а так же СИТ;
- лабораторный мониторинг и оценка эффективности СИТ.

Заклучение

В последние десятилетия частота аллергических заболеваний среди представителей взрослого и детского населения большинства развитых стран мира увеличивается из года в год. Помимо экологического неблагополучия, к причинам широкого распространения аллергических заболеваний можно отнести частые вирусные инфекции, дисбактериозы, возникающие при использовании антибиотиков, несбалансированное питание и рост потребления продуктов на основе «новых технологий» (в том числе содержащих разнообразные консерванты, красители, усилители вкуса и др.), необоснованный назначениями врача прием лекарств и биологически-активных пищевых добавок.

Диагностика аллергических заболеваний является важной медико-социальной проблемой современности, значение которой будет возрастать в последующие годы. Как правило, дебют аллергического заболевания возникает уже в детском возрасте,

однако 70-75% всех аллергий по данным популяционных исследований протекают в легкой форме, поэтому такие пациенты редко обращаются к врачу. Следовательно гиподиагностика аллергических заболеваний, в результате которой больные с легкими формами заболеваний выпадают из-под врачебного контроля и не получают адекватной терапии, приводит к тому, что данные пациенты составляют группу риска развития более тяжелых форм и осложнений аллергии. Решение этой проблемы в значительной степени зависит от уровня профессиональной подготовки по аллергологии и иммунологии не только иммунологов и аллергологов, но и врачей общей практики, терапевтов, хирургов, а также специалистов клинической лабораторной диагностики.

Лабораторная диагностика аллергических заболеваний представляет собой сложную задачу. Для того чтобы справиться с ее решением лечащему врачу необходимо обладать современными сведениями о возможностях лабораторных методов, используемых для выявления специфических и патогенетических изменений в организме больного аллергией, а также правильной методологией и организацией диагностического процесса. Все методы клинической лабораторной диагностики совершенствуются за счет использования новых технологических достижений. В этом плане лабораторные методы аллергологической диагностики также изменились. Так, на смену обычному (прямому) варианту ИФА, предназначенному для выявления аллергенспецифического IgE, в последнее десятилетие XX века пришел его конкурентный вариант, который в дальнейшем также был модернизирован. В последующие годы была разработана более совершенная технология определения концентрации аллергенспецифического IgE в сыворотке крови человека методом двухстадийного «capture»-варианта иммуноферментного анализа. Такие лабораторные технологии иммуноферментного анализа, позволяющие определять специфические иммуноглобулины E, обладают рядом неоспоримых преимуществ: это эко-

номическая доступность (низкая себестоимость одного теста) и лучшее соотношение цена/качество исследования (по основным характеристикам – стоимость 1 исследования, чувствительность и специфичность), простота выполнения (не требуют специальной квалификации персонала), возможности полноценной автоматизации исследований, обработки и хранения полученной информации, высокий уровень стандартизации и контроля качества.

Кроме внедрения новых методических подходов, совершенствовались технологии и качественные характеристики всех компонентов, использующихся при проведении реакций *in vitro*: твердой фазы, связывающие свойства которой были повышены в десятки раз, моноклональных антител и конъюгатов антител, участвующих в иммунных реакциях, ферментных и люминесцентных меток, предназначенных для выявления результатов. Были разработаны и внедрены новые технические средства – автоматизированные приборы для иммуноферментного или иммунохемилюминесцентного анализа и регистрации результатов исследований. В эти же годы происходило накопление новых научных данных, характеризующих особенности иммунных и аллергических реакций, участвующих в них клеток, рецепторных изменениях, возникающих на различных клетках после стимуляции их аллергеном. Все эти сведения были использованы для формирования и совершенствования новых современных диагностических средств, в частности различных вариантов базофильных тестов.

Большой прогресс был достигнут и в том, что один из основных участников, использующийся для выявления аллергических реакций *in vitro* – аллерген, в последние десятилетия претерпел существенные изменения. Еще сравнительно недавно, вплоть до 90-х годов XX века, аллергологи и специалисты клинической лабораторной диагностики России могли использовать для специфической диагностики только водно-солевые экстракты.

Они, несомненно, обладали рядом достоинств, к числу которых относились: низкая стоимость, присутствие в экстракте всего комплекса аллергенных компонентов, находившихся в исходном продукте, сохранение нативной структуры аллергенов, простота технологии получения экстракта. Однако, присутствовали и существенные недостатки данной технологии – трудности стандартизации из-за естественной вариабельности состава активных компонентов и их изоформ, так называемая межлотовая вариабельность чувствительности и специфичности, а также и присутствие балластных веществ, требующих очистки экстракта. Но главным недостатком этой технологии всё же была невозможность получения отдельных аллергенных компонентов. Решение этой задачи удалось добиться только с внедрением новой, рекомбинантной технологии получения аллергенных компонентов. В результате выделения и последующего изучения свойств аллергенных компонентов была создана их международная классификация, включавшая в характеристику аллергена первые 3 буквы латинского названия рода, затем первую букву вида и арабскую цифру номера аллергена (в зависимости от порядка выделения или клинической важности). Например, *Dermatophagoides farinae*-Der f1 Der – род, f – вид, 1 – гомотогичные аллергены разных видов.

Это позволило всем медицинским специалистам в едином ключе понимать, о каком аллергене идет речь в случае диагностики или лечения. В зависимости от способности связывания с IgE-антителами в сыворотке крови аллергены были разделены на мажорные (50%), средние (от 10 до 50%) и минорные (менее 10%).

В настоящее время представления о множественности аллергенных компонентов, содержащихся в экстрактах или продуктах, положено в основу нового диагностического подхода – компонентной диагностики. Она базируется на возможности использования результатов лабораторной аллергологической

диагностики, проводимой на основе реакции с аллергенными компонентами, для прогнозирования эффективности специфической иммунотерапии (СИТ). И поскольку эффективность СИТ связана с профилем исходной сенсибилизации, то анализ такого профиля имеет существенное значение для клинициста – как для назначения СИТ, так и для лабораторного контроля ее эффективности.

Однако сами по себе технологии не могут решить проблемы диагностики. В этом плане одной из важнейших задач является правильное сопоставление клинической и лабораторной диагностической информации. Ранее уже было подчеркнуто, что специфическая аллергологическая диагностика осуществляется только комплексно, включая ряд последовательных этапов: сбор аллергологического анамнеза, кожные и провокационные аллергические тесты, клинические и лабораторные исследования. И если такие диагностические подходы, как сбор аллергологического анамнеза, кожные и провокационные аллергические тесты, остались практически неизменными на протяжении последних десятилетий, то методы лабораторных аллергологических исследований, а самое главное получаемая на их основе диагностическая информация, за это же период существенно изменились. Потребовалось новое осмысление всего процесса аллергодиагностики, прежде всего сопоставления клинических и лабораторных результатов специфической аллергологической диагностики.

Анализ этих данных показывает еще достаточно большой процент несовпадений между ними. Безусловно, полного соответствия таких результатов достичь принципиально невозможно, поскольку объект исследований у них разный: в случае клинических исследований это целый человек, при лабораторных тестах изучаются его части, чаще всего жидкости – кровь, лимфа, спинномозговая жидкость и т.п. Однако накапливаются сведения о других причинах таких различий, обусловлен-

ных природой аллергенов, патогенетическими особенностями клинических методов аллергодиагностики, специфичностью и чувствительностью используемых лабораторных методов исследований. Анализ современных сведений, касающихся этих вопросов, была посвящена данная работа. Поскольку прогресс не стоит на месте, то внедрение новых лабораторных методов и технологий аллергологической диагностики, повышение их специфичности, а также понимание значения полученных результатов, происходящее в последние годы, уменьшает различия, неизбежно возникающие при трактовке клинических и лабораторных данных.